

# ВИРУСОЛОГИЯ

---

3



Издательство  
«МИР»

---











# Fundamental Virology

## Chief Editors

### **BERNARD N. FIELDS, M. D.**

The Adele Lehman Professor of  
Microbiology and Molecular  
Genetics  
Professor of Medicine, and  
Chairman,  
Department of Microbiology and  
Molecular Genetics  
Harvard Medical School and  
Brigham and Women's Hospital;  
and The Shipley Institute of  
Medicine Boston, Massachusetts

### **DAVID M. KNIPE, PH. D.**

Associate Professor of  
Microbiology and Molecular  
Genetics  
Department of Microbiology and  
Molecular Genetics  
Harvard Medical School  
Boston, Massachusetts

## Associate Editors

### **ROBERT M. CHANOCK, M. D.**

Laboratory of Infectious  
Diseases  
National Institute of Allergy and  
Infectious Diseases  
National Institutes of Health  
Bethesda, Maryland

### **BERNARD ROIZMAN, SC. D.**

Department of Molecular Genetics  
and Cell Biology  
University of Chicago  
Chicago, Illinois

### **JOSEPH, L. MELNICK, PH. D.**

Department of Virology and  
Epidemiology Baylor College of  
Medicine Texas Medical Center  
Houston, Texas

### **ROBERT E. SHOPE, M. D.**

Department of Epidemiology and  
Public Health  
Yale University School of  
Medicine  
New Haven, Connecticut

# ВИРУСОЛОГИЯ

---

В 3-х томах

3

Под редакцией Б. ФИЛДСА, Д. НАЙПА  
при участии  
Р. ЧЕНОКА, Б. РОЙЗМАНА, ДЖ. МЕЛНИКА, Р. ШОУПА

Перевод с английского  
канд. биол. наук А. В. ГУДКОВА,  
канд. физ.-мат. наук Л. В. МАЛИНИНОЙ,  
д-ра мед. наук Е. И. СКЛЯНСКОЙ,  
канд. биол. наук К. М. ЧУМАКОВА

под редакцией  
проф. Н. В. КАВЕРИНА,  
проф. Л. Л. КИСЕЛЕВА



Москва «Мир» 1989

ББК 28.4

B52

УДК 578

Авторы: Холмс К. Б., Ливингстон Д. М., Бикел И., Бернс К. И., Музычка Н., Хаусвирт У. В., Хорвиц М. С., Ройзман Б., Баттерсон У., Мосс Б., Робинсон У. С., Сарнгадхаран М. Г., Маркхэм П. Д., Галло Р., Гайдушек Д. К.

**Вирусология:** В 3-х т. Т. 3: Пер. с англ./Под ред. В52 Б. Филдса, Д. Найпа при участии Р. Ченока, Б. Ройзмана, Дж. Мелника, Р. Шоупа. — М.: Мир, 1989. — 452 с., ил.

ISBN 5-03-000285-5

Фундаментальное руководство по вирусологии, написанное известными специалистами из США и Англии. Книга может служить учебным и справочным пособием. На русском языке выходит в 3-х томах.

В третьем томе рассмотрено более 10 отдельных групп вирусов.

Для вирусологов, молекулярных биологов, медиков, а также студентов и аспирантов, специализирующихся в области вирусологии.

В  $\frac{1905000000-090}{041(01)-89}$  103-89

ББК 28.4

*Редакция литературы по биологии*

ISBN 5-03-000285-5 (русск.)  
ISBN 5-03-000282-0  
ISBN 0-88167-211-4 (англ.)

© 1986 by Raven Press Book, Ltd.  
© перевод на русский язык,  
«Мир», 1989

## Репликация коронавирусов

Кэтрин В. Холмс<sup>1</sup>

Коронавирусы — большие РНК-содержащие вирусы, которые имеют липопротеиновую оболочку. Они вызывают заболевания у человека и домашних животных (табл. 25.1). Сначала первые выделенные коронавирусы отнесли к ортомиксо- или парамиксовирусам, поскольку они напоминали последних по структуре и размерам частиц и также были выделены от больных при респираторных инфекциях [9]. Однако сейчас очевидно, что коронавирусы представляют собой отдельную группу вирусов, во многом отличающихся от ортомиксо- и парамиксовирусов [89, 113—115]. Коронавирусы содержат плюс-цепь РНК и обладают уникальным механизмом репликации. У них отсутствует нейраминидазная активность, и они не связываются с рецепторами, содержащими сиаловую кислоту. Основные свойства коронавирусов приведены в табл. 25.2.

Вначале коронавирусы были выделены в отдельную группу на основании морфологических отличий, хорошо заметных на негативно окрашенных препаратах вирионов (рис. 25.1, А) [113]. Из оболочки вирусных частиц диаметром 80—160 нм выступают большие, хорошо различимые гликопротеиновые выступы в виде булав — пепломеры. Свое название коронавирусы получили благодаря сходству этих выростов с согопа *spina*gum — терновым венцом вокруг головы святого на средневековых религиозных картинах (Z. Almeida, личное сообщение). Некоторым авторам протяженные, радиально расположенные выступы напоминают солнечную корону [113]. В течение многих лет впервые обнаруживаемые вирусы относили к группе коронавирусов только по их характерной морфологии [111], да и сейчас выделенные коронавирусы идентифицируют с использованием негативного контрастирования.

Поскольку многие коронавирусы плохо размножаются в культуре ткани, молекулярно-биологическое исследование их репликации отстает от аналогичных исследований других вирусов. Лишь недавно были установлены характерные биохимиче-

---

<sup>1</sup> Kathryn V. Holmes, Department of Pathology, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland 20814.

Таблица 25.1. Коронавирусы: названия, природные хозяева и заболевания

Антигенная группа	Вirus <sup>1</sup>	Хозяин	Респираторная инфекция	Кишечная инфекция	Гепатит	Нейро-инфекция	Другие инфекции <sup>2</sup>
I	HCV-229E	Человек	+				
	TGEV	Свинья	+	+			+
	CCV	Собака		+			
	FECV	Кошка		+			
II	FIPV	»	+	+	+	+	+
	HCV-OC43	Человек	+				
	MNV	Мышь	+	+	+	+	
	HEV	Свинья	+	+		+	
III	BCV	Корова		+			
	RbCV	Кролик		+			+
	IBV	Курица	+				+
	TCV	Индюк	+	+			
IV	HECV	Человек		+			
Неклассифицированные вирусы				+			

<sup>1</sup> Сокращения: HCV-229E — респираторный коронавирус человека; TGEV — вирус инфекционного гастроэнтерита свиней; CCV — коронавирус собак; FECV — кишечный коронавирус кошек; FIPV — вирус инфекционного перитонита кошек; HCV-OC43 — респираторный коронавирус человека; MNV — вирус гепатита мышей; HEV — гемагглютинирующий вирус энцефаломиелита свиней; BCV — коронавирус крупного рогатого скота; RbCV — коронавирус кроликов; IBV — вирус инфекционного бронхита птиц; TCV — коронавирус индюков (болезнь синего гребешка у индюков); HECV — кишечный коронавирус человека.

<sup>2</sup> Другие инфекции включают такие болезни, как инфекционный перитонит, нефрит, панкреатит, низкорослость и аденит.

Таблица 25.2. Свойства коронавирусов

Структура	Сферический вирион диаметром 80—160 нм Оболочка с большими, далеко отстоящими друг от друга пепломерами
Геномная РНК	Спиральный нуклеокапсид диаметром 10—20 нм Плюс-цепь Одна молекула: мол. масса $5,5 \cdot 10^6$ Полиаденилирована, имеет кэп Может служить в качестве мРНК
Структурные белки	Пепломерный гликопротеин Е2 (180—200 К) Нуклеокапсидный фосфопротеин N (50—60 К) Матриксный гликопротеин Е1 (23—30 К)
Биологическая и ферментативная активность вирионов	Слияние клеток Гемагглютинация <sup>1</sup> Протеинкиназа
Место почкования мРНК	Мембраны ШЭР и аппарата Гольджи Перекрывающийся набор мРНК с общим 3'-концом При трансляции гена на 5'-конце каждой мРНК образуется 1 полипептид

<sup>1</sup> Не все коронавирусы вызывают гемагглютинацию.



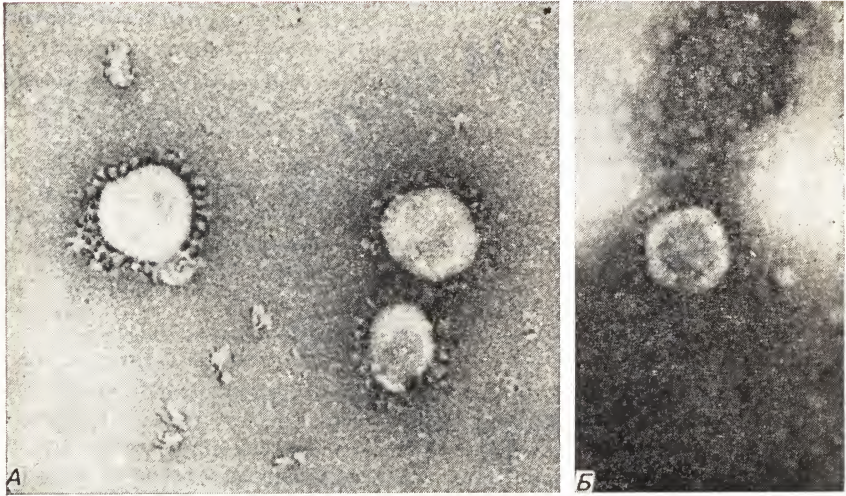


Рис. 25.1. Полученные методом негативного контрастирования фотографии препаратов респираторного коронавируса человека HCV-OC43 (А) и кишечного коронавируса человека HECV (Б). Коронавирусы легко отличить от других вирусов с оболочкой по большим, далеко отстоящим друг от друга пепломерам, или «шипам», которые образуют вокруг вирусных частиц «корону».  $\times 90\,000$ . (Рис. Б взят из [22] с согласия авторов.)

ские особенности коронавирусов [88, 104] (табл. 25.2), идентифицированы классы мРНК, их нуклеотидные последовательности, а также структурные белки. Это облегчает идентификацию новых выделяемых вирусов и отнесение их к группе коронавирусов. Изучению эпидемиологии и патогенеза коронавирусных инфекций по-прежнему мешает трудность выделения коронавирусов от больных. Например, некоторые респираторные коронавирусы человека (HCV) могут быть выделены только с применением органных культур трахеи зародыша человека или слизистой носа [51]. Морфологически похожие на коронавирусы частицы, которые можно видеть на электронно-микроскопических препаратах кала человека, до сих пор не удается размножить [65]. Причина видовой специфичности и ограниченности круга хозяев при репликации коронавирусов в настоящее время неясна.

### Структура вирионов

Общая схема структуры коронавирусов показана на рис. 25.2 [104]. Вирусный геном представляет собой одноцепочечную РНК (плюс-цепь) длиной от 16 до 21 kb. Как и в случае других

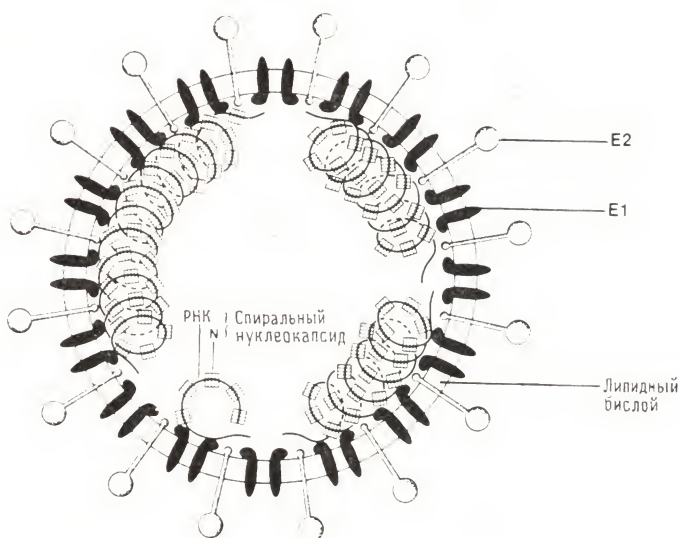


Рис. 25.2. Модель коронавируса. Вирусный нуклеокапсид представляет собой протяженную, гибкую спираль, содержащую геномную плюс-РНК (мол. масса  $5,5 \cdot 10^6$ ) и большое число молекул фосфорилированного нуклеокапсидного белка N (50—60K). Вирусная оболочка состоит из липидного бислоя, образующегося из внутриклеточной мембраны клетки-хозяина, и двух вирусных гликопротеинов, E1 (20—30K) и E2 (180—200K). Пепломеры состоят из молекул E2. Матриксный гликопротеин E1 пронизывает липидный бислой и взаимодействует с нуклеокапсидом внутри вирусной частицы.

вирусов, содержащих плюс-цепь РНК, геномная РНК коронавирусов инфекционна при введении в клетки эукариот [57, 83]. Молекулы основного фосфопротеина N (50—80 K), взаимодействуя с геномной РНК, образуют гибкий, протяженный нуклеокапсид, обладающий спиральной симметрией [15, 66, 98, 103]. В зависимости от плоскости сечения на тонких срезах вирионов такие спиралеобразные нуклеокапсиды видны в виде «бублика» или трубчатой нити диаметром 9—11 нм. Нуклеокапсид окружен липопротеиновой оболочкой, формирующейся из шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭР) или аппарата Гольджи зараженных клеток [21, 23, 69, 75]. Оболочка состоит из липидного бислоя, включающего два вирусных гликопротеина, E1 и E2, основные свойства которых приведены в табл. 25.3 [26, 103, 107]. Соотношение структурных белков в вирионе — 8N : 16 E1 : 1 E2 [107].

Гликопротеин E1 (20—30 K) является трансмембранным белком, который в некоторых отношениях существенным образом отличается от гликопротеинов других вирусов [33, 88, 104]. Он погружен в оболочку довольно глубоко, так что на наружной

Таблица 25.3. Функции коронавирусных гликопротеинов

## Пепломерный гликопротеин E2

- Антирецептор; связывается с рецепторами клетки-хозяина
- Вызывает слияние клеток<sup>1</sup>
- Может вызывать слияние вирусной оболочки с мембраной клетки<sup>1</sup>
- Индуктирует образование нейтрализующих антител
- Вызывает иммунитет, опосредованный клетками

## Матриксный гликопротеин E1

- Обеспечивает почкование от мембран ШЭР и аппарата Гольджи
- Образует вирусную оболочку
- Взаимодействует с вирусным нуклеокапсидом

<sup>1</sup> По-видимому, активируется при протеолитическом расщеплении.

поверхности липидного бислоя оказывается лишь небольшой гликозилированный N-концевой участок белка [80, 103]. Последовательность аминокислот E1, определенная по нуклеотидной последовательности клонированного гена, дает основания предполагать, что два гидрофобных домена гликопротеина погружены в липидный бислой, а большой домен расположен непосредственно под бислоем [3, 17]. Такая локализация гликопротеина E1 подтверждается также опытами по синтезу E1 *in vitro* [80]. Функции E1, по-видимому, такие же, как и у негликозилированных матриксных белков ортомиксо-, парамиксо- и рабдовирусов, которые способствуют включению нуклеокапсида в оболочку вируса при почковании. В отличие от других вирусных гликопротеинов E1 не переносится на плазматическую мембрану [33, 104]. Его накопление происходит в аппарате Гольджи, и поэтому именно здесь, а не на плазматической мембране протекает процесс почкования коронавирусов [33]. В отличие от большинства других вирусных гликопротеинов, у которых гликозилированы аспарагиновые остатки, гликопротеины E1 некоторых коронавирусов гликозилированы по сериновым и треониновым остаткам [34, 72, 73]. Антитела к E1 нейтрализуют инфекционность вирусных частиц только в присутствии комплемента [20].

Второй гликопротеин коронавирусов — E2 (180—200 К) — напоминает гликопротеины больших вирусов, содержащих минус-цепь РНК: в липидный бислой погружена только небольшая часть молекулы гликопротеина, тогда как большая часть молекулы находится снаружи. E2 гликозилируется по аспарагиновым остаткам и затем переносится на плазматическую мембрану зараженных клеток [16, 33, 102, 104]. Он является структурным белком пепломеров и поэтому играет роль антирецептора, с помощью которого вирусная частица прикрепляется к рецепторам на поверхности клетки [33]. Антитела к E2 нейтрализуют инфекционность вируса [20, 25], а присутствие E2 на плазматической мембране делает зараженные коронавирусом клет-



ки восприимчивыми к цитотоксическим лимфоцитам [121]. Расщепление гликопротеина E2 протеазами клетки-хозяина на два полипептида с мол. массой по 90 К индуцирует способность вируса вызывать слияние клеток [35, 103, 105].

Как и у других вирусов с плюс-цепью РНК, в вирионе коронавируса нет РНК-зависимой РНК-полимеразы. В очищенных вирионах присутствует протейкиназная активность, однако неясно, какова ее функция; более того, неизвестно, какому ферменту принадлежит эта активность: вирусному или клеточному [88, 89, 104]?

### **Коронавирусы животных**

Коронавирусы домашних и лабораторных животных вызывают множество заболеваний, которые могут иметь большие экономические последствия [117] (см. табл. 25.1). Некоторые из этих вирусов интенсивно исследовались и служили модельной системой при изучении молекулярной биологии всей группы коронавирусов. К ним относятся вирус инфекционного бронхита птиц (IBV) [16, 17, 94—96] и вирус гепатита мышей (MHV) [6, 44, 46, 47, 87, 88, 104], который вызывает кишечную, респираторную и неврологическую инфекцию у мышей [44, 117]. Коронавирусы животных служат хорошими модельными системами при изучении коронавирусного патогенеза. Большинство коронавирусов обладают значительной тропностью к клеткам эпителия дыхательных путей и кишечного тракта. Не совсем ясно, почему в отличие от большинства других вирусов, имеющих оболочку, коронавирусы способны реплицироваться в кишечном тракте. Характерно, что кишечные коронавирусы вызывают слабые или незаметно протекающие инфекции у взрослых особей и тяжелые, сопровождающиеся поносом заболевания у новорожденных и молодых животных [7]. Многие коронавирусы вызывают персистентную инфекцию *in vivo* [36, 41, 56].

Согласно данным серологических исследований с помощью иммунофлуоресцентного анализа, иммуноферментного сорбционного анализа (ELISA), тестов нейтрализации вирусов и иммунной электронной микроскопии (табл. 25.1) имеются четыре группы коронавирусов, различающихся по своим антигенным свойствам [76, 88, 104, 117]. Внутри каждой группы вирусов имеют место частичные антигенные перекресты, однако вирусы одной группы легко различаются по специфичности к хозяину и клиническим синдромам.

### **Коронавирусы человека**

Результаты сероэпидемиологических исследований и выделения вирусов показывают, что коронавирусы являются причиной 15—20% инфекционных заболеваний верхних дыхательных пу-

тей человека [51, 59, 63, 64, 117]. Они могут вызывать и другие заболевания, такие, как пневмония и миокардит [62, 77]. Респираторные коронавирусы человека HCV-229E и HCV-OC43 принадлежат к разным группам (табл. 25.1) и по своим антигенным свойствам отличаются от кишечных коронавирусов человека [19, 61, 64, 117].

Так как многие коронавирусы животных вызывают гастроэнтерит [117] (табл. 25.1), их интенсивно изучали как источник кишечных инфекций человека [14]. В кале больных гастроэнтеритами небактериального происхождения, так же как в кале некоторых здоровых людей, участвующих в испытаниях в качестве контроля, при электронно-микроскопических исследованиях часто обнаруживают частицы, похожие на коронавирусы [13, 71, 122] (рис. 25.1, Б). Однако кишечные коронавирусы человека (HECV) чрезвычайно трудно выращивать в культуре ткани и даже в органной культуре эмбрионального кишечного эпителия человека [65, 71]. К сожалению, тесты для диагностики HECV, которые позволили бы определить роль коронавирусов в этиологии гастроэнтеритов человека, до сих пор не разработаны.

Поскольку некоторые коронавирусы животных вызывают неврологические заболевания [1, 116, 117, 119], были проведены исследования возможной роли коронавирусов в неврологических заболеваниях человека. При помощи электронной микроскопии коронавирусы были обнаружены в тонких срезах мозга человека [109], два коронавируса были выделены из мозга больных рассеянным склерозом [12]. На основании гибридизации нуклеиновых кислот и серологических тестов был сделан вывод о том, что эти вирусы очень похожи на вирусы MNV и HCV-430C [27, 120]. Поскольку для выделения этих вирусов требовалось пассирование в мышах и культуре их ткани, в которых мог присутствовать MNV [81], нет абсолютной уверенности в том, что выделенные вирусы относятся к коронавирусам человека, а не мышей. Таким образом, роль коронавирусов в неврологических заболеваниях человека пока не выяснена.

## Размножение коронавирусов

В культуре ткани коронавирусы имеют латентный период от 6 до 7 ч [106]. Инфекционные вирусы могут быть выделены из культуральной жидкости и из клеток, разрушенных замораживанием — оттаиванием. Инфекционность вирусов определяют как *in vivo*, так и *in vitro*. Поскольку большинство коронавирусов размножаются только в животных одного вида или очень близкородственных видов [117], тест на инфекционность вируса *in vivo* — задача не из легких. Так, например, респираторные коронавирусы человека приходится тестировать на добровольцах

[10, 67]. Инфекционность тех коронавирусов, которые растут в культуре ткани, можно определять по «конечной точке» титрования ( $ID_{50}$ ) или методом бляшек. Некоторые коронавирусы образуют бляшки только в присутствии трипсина [100]. Для тех коронавирусов, которые, подобно HCV-OC43, вызывают гемагглютинацию эритроцитов, общее число вирусных частиц (инфекционных + неинфекционных) можно оценить при помощи реакции гемагглютинации [38].

Коронавирусы могут вызывать как вирулентную, так и умеренную инфекцию в зависимости от штамма вируса и от типа клетки-хозяина [35, 104, 117]. При вирулентной инфекции клетки могут сливаться, образуя синцитий, и(или) лизироваться. Например, синцитий часто наблюдают при заражении клеток кишечного эпителия вирусом MNV [8]. Иногда в зараженных клетках накапливаются вирусные нуклеокапсиды [23, 69]. В отличие от вирулентных инфекций, губительно действующих на клетки, в некоторых клеточных культурах при заражении вирусом HCV-229E вирусные частицы образуются в течение нескольких недель и даже более, но гибели клеток или каких-либо цитопатических эффектов не наблюдается [18]. Персистентная инфекция, вызванная другими коронавирусами, приводит к образованию культуры-носителя, в которой в любой момент времени только часть клеток образует инфекционные вирусные частицы [32, 58]. Из такой культуры можно выделить мутантные вирусы с измененной вирулентностью. Персистирование коронавирусов при иннаппарантных инфекциях у животных может служить объяснением, как эти довольно лабильные вирусы способны выживать в природе, несмотря на очень ограниченный выбор хозяев. Молекулярная природа персистентных инфекций у этой группы РНК-содержащих вирусов до сих пор не выяснена.

Часто размножение коронавируса *in vitro* отражает его патогенность для животных. Например, у мышей некоторых линий MNV вызывает гибель от гепатита или неврологического заболевания, в то время как мыши других линий устойчивы к этому вирусу [4, 5]. Такая устойчивость определяется у мышей одним или несколькими генами, причем ген чувствительности к MNV является доминантным [4, 5, 40, 97]. Если культуры перитонеальных макрофагов из чувствительных линий заразить MNV, в них образуется большое количество вирусных частиц и они быстро разрушаются. В противоположность этому культуры макрофагов, полученные из устойчивых линий мышей, устойчивы к заражению MNV, продуцируют небольшое число вирусных частиц (или вообще их не продуцируют) и характеризуются минимальным цитопатическим эффектом [5]. Образование вирусов в таких культурах можно изменять при помощи



лекарственных препаратов, например кортизона, влияющего также на репликацию вирусов *in vivo* [110].

Как уже отмечалось выше, коронавирусы обладают заметной тропностью по отношению к определенным тканям. Многие из них растут только в клетках тех видов, которые являются природными хозяевами, другие для полного цикла вирусной репликации требуют дифференцированных клеток [59, 60, 112]. В культурах дифференцированных клеток спинного мозга мышей МНВ проявляют отчетливую тропность по отношению к глиальным клеткам [23], что коррелирует с ситуацией *in vivo*, когда этот вирус вызывает демиелинизацию, селективно поражая олигодендроглиальные клетки [30, 42]. Однако механизм ограничения репликации коронавирусов в клетках различных типов или в генетически устойчивых животных неизвестен.

Одним из факторов, способных превращать abortивные коронавирусные инфекции в пермиссивные вирулентные инфекции, является трипсин [100, 124]. Для продуцирования инфекционных вирусных частиц и достижения цитопатического эффекта в культуральную среду зараженных BSV культур клеток мозга или щитовидной железы крупного рогатого скота необходимо добавлять трипсин [100]. Этот коронавирус обычно реплицируется в кишечнике, где присутствует трипсин. Протеолитическая активация вирусной инфекционности и цитопатических эффектов была также обнаружена у ортомиксо-, парамиксо- и ротавирусов [24, 39]. Это вызвано расщеплением неактивных вирусных белков до биологически активных форм. В случае коронавирусов для инфекционности вируса и достижения цитопатического эффекта, по-видимому, требуется расщепление пепломерного гликопротеина E2 [35, 104, 105]. Клетки, образующие инфекционные частицы коронавирусов без добавления трипсина, возможно, расщепляют E2 клеточными протеазами в аппарате Гольджи или на плазматической мембране.

## Репликация коронавирусов

Недавние исследования вирусов МНВ и IBV показали, что коронавирусы обладают некоторыми уникальными особенностями в транскрипции РНК, в составе белков и в механизме сборки [87—89, 104]. Эти особенности мы подробно обсудим, используя в качестве модели коронавирусов человека МНВ, поскольку он сходен с вирусом HCV-OC43. Процессы, происходящие в цитоплазме зараженных клеток при репликации коронавирусов, схематично представлены на рис. 25.3. Безъядерные клетки спо-

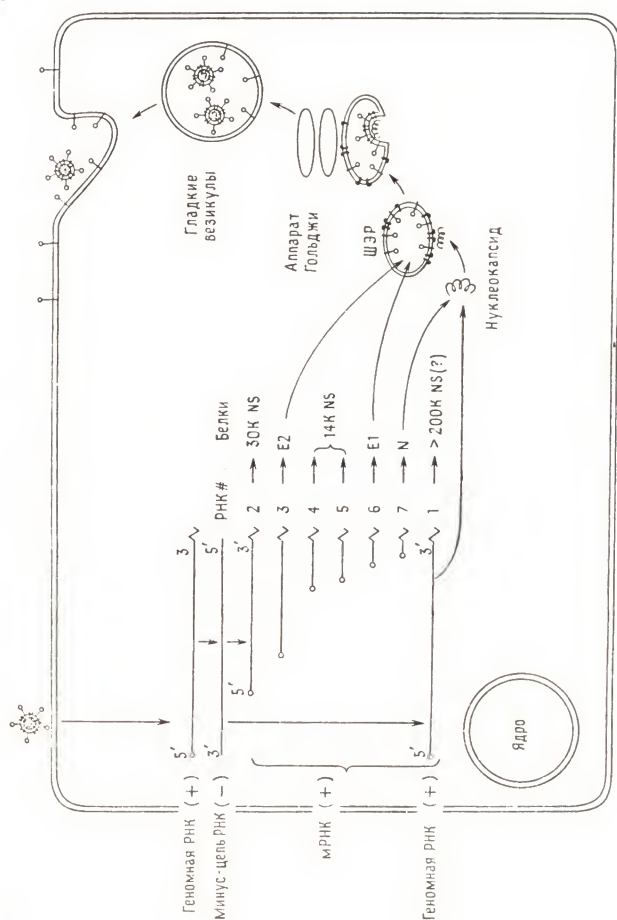


Рис. 25.3. Модель репликации коронавируса. Вирионы присоединяются к клетке при помощи содержащих E2 пептидов; вирус проникает в клетку при слиянии вирусной оболочки с плазматической мембраной или посредством эндоцитоза. Геномная РНК служит в качестве мРНК при синтезе РНК-зависимой РНК-полимеразы, которая считывает геномную РНК, синтезируя минус-цепь полной длины. При считывании минус-цепи образуются новая геномная плюс-РНК и набор субгеномных мРНК. Геномная РНК и мРНК имеют кэп и полиадениловый участок  $\sim$  и составляют семейство родственных молекул с общими 3'-концами. Все они имеют общую лидерную последовательность на 5'-конце  $\circ$ —, которая закодирована на 3'-конце матричной минус-цепи. При транскрипции каждой



мРНК образуется один белок, РНК 7 кодирует белок N, синтез которого происходит на свободных полисомах. Белок N связывается с геномной РНК, в результате чего образуется спиральный нуклеокапсид. РНК 3 и 6 кодируют гликопротеины Е2 и Е1, которые синтезируются на полисомах, связанных с мембраной. Гликопротеин Е2 при трансляции гликозилируется по аспарагиновым остаткам и переносится через аппарат Гольджи, где происходит ацилирование, концевое отщепление (тримминг) олигосахаридов и протеолитическое расщепление на две субъединицы 90К. Избыточные молекулы Е2, которые не вошли в состав вирионов, переносятся на плазматическую мембрану. Матриксный гликопротеин Е1 переносится в аппарат Гольджи, где он гликозилируется по сериновым и треониновым остаткам. Этот гликопротеин на плазматическую мембрану не переносится. Вирионы отпочковываются только от мембран ШЭР и аппарата Гольджи, где не от плазматической мембраны. Они выходят из клетки при ее лизисе или при слиянии образовавшихся в аппарате Гольджи везикул, содержащих вирионы, с плазматической мембраной. Большое число вирионов адсорбируется на плазматической мембране зараженных клеток. (Адаптировано из [104], с разрешения.)

способны поддерживать нормальную репликацию коронавирусов [123].

### Прикрепление и проникновение

Коронавирусы прикрепляются к рецепторам клеток-мишеней концами своих пепломеров [21, 70, 108]. В настоящее время не вполне ясно, как вирусные частицы проникают в клетку — благодаря слиянию вирусной оболочки с плазматической мембраной или за счет эндоцитоза с последующим слиянием вирусной оболочки с мембраной эндоцитозной везикулы? Тот факт, что инфекционность коронавирусов подавляется лизосомотропным препаратом хлорокином, свидетельствует о том, что, как и в случае альфавирусов и ортомиксовирусов, основным способом проникновения в клетку коронавирусов является абсорбционный эндоцитоз [29, 68].

### Первичная трансляция

У всех вирусов, содержащих плюс-цепь РНК, после проникновения первым событием вирусного цикла является прикрепление геномной РНК к рибосомам, что приводит к синтезу вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы [101]. Об этой стадии репликации коронавирусов мало что известно. Геномная РНК коронавирусов аденилирована и имеет кэп. При ее трансляции *in vitro* образуется только неструктурный полипептид 200 К, ген которого расположен на 5'-конце молекулы [44, 45, 55]. Полагают, что данный полипептид играет определенную роль в РНК-зависимой РНК-полимеразной активности, однако прямых доказательств этого пока нет. Неизвестно, требуется ли для биологической активности этого полипептида дальнейший процессинг, как в случае альфавирусов, у которых транслируется лишь 5'-конец геномной плюс-цепи РНК с образованием неструктурных белков, в том числе РНК-полимеразы [101]. Чтобы

сравнить репликацию коронавирусов с репликацией других вирусов, содержащих плюс-цепь, нужна дополнительная информация о продуктах трансляции коронавирусной геномной РНК.

### Синтез минус-цепи РНК

Вирусную РНК-полимеразную активность обнаруживают в мембранной фракции зараженных клеток спустя 2—3 ч после инокуляции вируса [11]. При транскрипции геномной РНК этим ферментом образуется комплементарная минус-цепь РНК полной длины, которая имеет на 5'-конце последовательность poly (U) [6, 46, 52]. Синтез этой РНК заканчивается через 5—6 ч после заражения.

### Синтез плюс-цепи РНК

Минус-цепь РНК служит матрицей для синтеза как новых геномных РНК, так и шести имеющих кэп полиаденилированных субгеномных РНК, молекулярная масса которых лежит в диапазоне  $(0,6—3,7) \cdot 10^6$  [47, 88, 104]. Общая длина этих мРНК значительно превышает размер геномной РНК, причем некоторые из субгеномных РНК значительно длиннее, чем большинство мРНК эукариот. Олигонуклеотидное картирование геномной и субгеномных мРНК показывает, что они образуют набор перекрывающихся молекул с общим 3'-концом [50, 91, 94] (рис. 25.3). Каждая мРНК содержит всю нуклеотидную последовательность более короткой мРНК плюс один дополнительный ген на 5'-конце. У всех мРНК транслируется лишь последовательность, прилегающая к 5'-концу [87, 104].

На 5'-конце геномной РНК к лидерной последовательности длиной около 70 оснований присоединен кэп. Лидерная последовательность присутствует также на 5'-конце каждой субгеномной мРНК, тогда как в каком-нибудь другом месте генома она не обнаружена [6, 47, 92]. Предполагали, что лидерная последовательность попадает в каждую из мРНК в результате сплайсинга во время транскрипции или после нее [49, 92]. Однако недавно показано, что лидерная РНК есть в синтезирующихся плюс-цепях мРНК, связанных с репликативным интермедиатом (РИ) [6]. Таким образом, лидерная последовательность транскрибируется с 3'-конца минус-цепи, служащей в качестве матрицы, и, по всей видимости, служит затравкой для синтеза плюс-цепей РНК. Последовательность poly (A) на общем 3'-конце плюс-цепей РНК транскрибируется непосредственно с последовательности poly (U) на 5'-конце минус-цепи [52].

Хотя синтез геномной РНК начинается с 3'-конца минус-цепи, синтез мРНК, происходящий путем удлинения затравоч-

ной или лидерной РНК, начинается, по-видимому, со специфических внутренних участков минус-цепи, которые пока не идентифицированы. Чтобы синтез протекал нормально, должен существовать какой-то механизм регуляции относительного числа различных плюс-цепей РНК, поскольку в зараженной клетке они образуются в неодинаковых количествах [54, 93, 118]. Доля каждой мРНК в течение всего цикла инфекции остается постоянной. Возможно, содержание различных плюс-цепей РНК в зараженных клетках определяется эффективностью разных иницирующих последовательностей. Свойства РНК-зависимой РНК-полимеразы, связанной с синтезом плюс-цепей РНК, несколько отличаются от свойств фермента, который осуществляет синтез минус-цепи [11, 47]. Основное различие заключается в том, что в случае синтеза плюс-цепей необходима РНК-затравка [6]; эти полимеразы различаются также седиментационными свойствами при центрифугировании в градиенте плотности и требованием разных необходимых для их работы концентраций ионов [48]. Полипептиды, с которыми связаны эти полимеразные активности, пока не охарактеризованы.

Предварительный генетический анализ группы температурочувствительных мутантов МНУ, полученных путем химического мутагенеза показывает, что существует по крайней мере семь комплементационных групп; мутации, входящие в шесть из них, влияют на синтез вирусной РНК [53]. Продукты генов, соответствующих этим комплементационным группам, пока не идентифицированы.

У МНУ и ИВУ клонированы гены *N* и *E1* и по их нуклеотидной последовательности определены аминокислотные последовательности полипептидов [2, 3, 17, 90]. В настоящее время проводится клонирование и секвенирование других генов и мРНК, что должно помочь в выяснении механизма синтеза лидерной РНК и инициации синтеза мРНК, в определении аминокислотной последовательности структурных белков и свойств неструктурных белков.

## Синтез структурных и неструктурных белков

При трансляции *in vitro* каждая вирус-специфическая мРНК дает только один полипептид, кодированный на ее 5'конце [55, 79, 85]. В этом заключается одно из отличий коронавирусов от других содержащих плюс-цепь РНК вирусов, таких, как пикорна- и альфавирусы, на мРНК которых при трансляции образуются полипротеины, дающие после протеолитического расщепления структурные и неструктурные белки [101]. На рис. 25.3 представлены кодирующие участки мРНК коронавирусов, а на





Рис. 25.4. Генетическая карта геномной РНК МНВ. Последовательность генов была определена с помощью олигонуклеотидного картирования и в опытах по трансляции *in vitro*. Функции неструктурных белков NS неизвестны. (Из [104], с разрешения.)

рис. 25.4 — генетическая карта, построенная при помощи фингерпринтов олигонуклеотидов и трансляции *in vitro* вирусных мРНК. Чтобы локализовать и выяснить функцию каждого из генов, определенных при помощи комплементации, требуются дополнительные генетические исследования.

Нуклеокапсидный белок N и некоторые неструктурные белки (30K, 14K и 200K) синтезируются, по-видимому, на полисомах в цитоплазматическом матриксе [55, 85]. Функции неструктурных белков неизвестны. Белок N фосфорилируется, однако роль фосфорилирования пока не выяснена [86, 97, 99]. Неясно также, какой геном — клеточный или вирусный — содержит ген протеинкиназы, которая входит в состав вирионов.

Синтез гликопротеинов E1 и E2 происходит на полисомах, прикрепленных к шероховатому эндоплазматическому ретикулуму (ШЭР), однако в их процессинге и транскрипции имеются важные различия [34]. Синтез пепломерного гликопротеина E2, по-видимому, происходит так же, как синтез гликопротеина G VSV и других вирусных гликопротеинов. При трансляции они включаются в мембрану ШЭР и гликозилируются путем переноса олигосахаридов с долихолфосфатных интермедиатов на аспарагиновые остатки растущей полипептидной цепи [39]. Обработка зараженных клеток туникамицином предотвращает гликозилирование E2 [34, 72]. Во время переноса E2 от ШЭР через аппарат Гольджи к плазматической мембране клеточные ферменты «подстригают» олигосахариды и ацилируют гликопротеин путем добавления остатков жирных кислот [82, 96]. На один пепломер приходится две или, возможно, три молекулы E2 [16], однако место сборки мономеров E2 при образовании пепломера неизвестно. Недавние исследования показали, что в аппарате Гольджи или на плазматической мембране E2 (180—200 K) расщепляется протеазами клетки-хозяина на два больших гликопептида (90K) [35, 95, 105]. Такое расщепление происходит не в любых клетках, и, вероятно, оно необходимо для проявления инфекционности вируса. У МНВ протеолитическое расщепление E2, по-видимому, активирует его способность вызывать слияние клеток [35, 105]. Иммуноэлектронная микроскопия и иммунофлуоресцентные исследования показывают, что E2

переносится на плазматическую мембрану [33, 35]. Присутствие E2 на мембране клетки-хозяина может делать клетки чувствительными к лизису под действием противовирусного антитела и комплемента или иммунного ответа, опосредованного клетками [35, 121]. E2 на плазматической мембране необходим также для вызываемого коронавирусами слияния клеток [35, 105].

Гликопротеин E1 также синтезируется на полисомах, связанных с мембранами, однако по процессингу и типу включения он отличается от большинства других вирусных гликопротеинов [34, 73]. У большей части вирусных гликопротеинов на N-конце находится сигнальная последовательность, с помощью которой конец нативного полипептида включается в мембрану ШЭР [39]. Включение происходит вскоре после начала синтеза белка. Однако E1 *in vitro* включается в мембрану лишь спустя 5 мин после инициации синтеза, и это означает, что его включение происходит при помощи внутренней сигнальной последовательности [80]. Аминокислотная последовательность E1 имеет несколько гидрофобных доменов, которые могут три раза «пронизать» мембрану, и, по-видимому, любой из них может служить сигнальной последовательностью [3, 17]. Процесс гликозилирования E1 также обладает рядом особенностей [34, 73]. Хотя в большинстве случаев олигосахариды присоединяются к вирусным гликопротеинам во время синтеза белка, исследования, выполненные с помощью импульсной метки, показывают, что в случае гликопротеина E1 MNV присоединение олигосахаридных остатков происходит уже после того, как синтез пептида закончился, по завершении переноса E1 в аппарат Гольджи. По типу олигосахаридов и их связи с белком E1 также отличается от большинства других вирусных гликопротеинов [73]. В случае MNV короткие олигосахаридные цепи, в которых нет маннозы и фукозы, присоединяются к остаткам треонина и серина на внешнем N-концевом домене молекулы E1 [3]. Такое гликозилирование с помощью О-гликозидной связи не зависит от переноса олигосахаридов от долихолфосфатного интермедиата и поэтому не ингибируется туникамицином. Гликопротеины поксвирусов и герпесвирусов также содержат олигосахариды, связанные с белком О-гликозидной связью [37, 74, 84]. Удивительно, что олигосахаридный состав E1 у разных коронавирусов сильно различается. В отличие от E1 MNV молекулы E1 IBV содержат присоединенные N-гликозидной связью сложные олигосахариды, подобные найденным в молекуле E2 [96]. Внутриклеточный транспорт E1 также отличается от транспорта других вирусных гликопротеинов [33, 104]. В зараженных клетках E1 переносится в аппарат Гольджи, где происходит его накопление, и не переносится в заметных количествах на плазматическую мембрану.

## Сборка вирионов

Спиральный нуклеокапсид коронавирусов образуется в цитоплазме зараженных клеток за счет взаимодействия вновь синтезированной РНК с молекулами белка N. Нуклеокапсид обладает гибкой, довольно рыхлой структурой и чувствителен к действию РНКазы; его плотность составляет  $1,24\text{--}1,29\text{ г/см}^3$  [15, 66, 107]. Размеры нуклеокапсида, по-видимому, определяются свойствами белка N, его способностью к связыванию. По сравнению с нуклеокапсидами ортомиксо-, парамиксо- или пневмовирусов нуклеокапсиды коронавирусов — значительно более хрупкие образования, их гораздо труднее выделить и наблюдать. Впрочем, большие агрегаты нуклеокапсидов иногда удается наблюдать в зараженных клетках на поздних стадиях инфекционного цикла [23].

Вирионы коронавирусов образуются путем почкования от мембран ШЭР и(или) аппарата Гольджи [21] (рис. 25.5). Нити нуклеокапсидов выстраиваются в месте почкования на цитоплазматической поверхности этих мембран в упорядоченный ряд, по-видимому, на участках, содержащих вирусные гликопротеи-

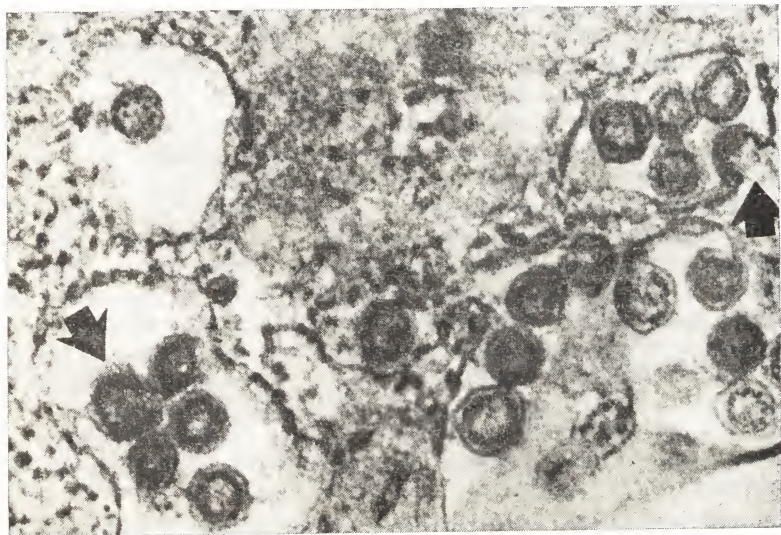


Рис. 25.5. Клетка, зараженная респираторным коронавирусом человека HCV-229E. На мембранах ШЭР и гладких везикул наблюдается почкование сферических вирионов коронавируса (стрелки). Внутри вирионов видны электроплотные нуклеокапсиды. Прежде чем выйти из клетки при помощи экзоцитоза или клеточного лизиса, вирионы выходят в полость ШЭР или проходят через аппарат Гольджи.  $\times 60\,000$ .



ны [23, 69]. На мембранах ШЭР или аппарата Гольджи белки клетки-хозяина исключаются из почкующихся вирионов и заменяются вирусными гликопротеинами. Ряд фактов свидетельствует о том, что взаимодействие нуклеокапсида и мембран ШЭР или аппарата Гольджи осуществляется с помощью цитоплазматического домена гликопротеина Е1. Во-первых, почкование коронавирусов происходит только на тех внутриклеточных мембранах, на которых локализованы молекулы Е1 [33, 35, 104]. На плазматической мембране может накапливаться значительное количество Е2, но на них никогда не происходит почкования вирионов, вероятно, потому, что там нет свободного Е1. Во-вторых, было показано, что выделенный Е1 связывается с нуклеокапсидом [107]. В-третьих, вирионы образуются на мембранах ШЭР и аппарата Гольджи в зараженных МНУ клетках, обработанных туникамицином, в которых содержится нормальное количество гликозилированного Е1 и очень мало молекул Е2 [33]. Поскольку эти вирионы содержат нормальное количество нуклеокапсидов и не содержат Е2, очевидно, что Е2 не нужен для формирования вирионов коронавирусов. Отсюда следует, что функции гликопротеина Е1 коронавирусов аналогичны функциям матриксных белков больших РНК-вирусов с негативным геномом и что его ограниченный внутриклеточный перенос обуславливает место почкования вирусов [33, 35, 104] (табл. 25.3).

Сферические почкующиеся вирионы, которые содержат собранный нуклеокапсид, «проталкиваются» в полость ШЭР и аппарата Гольджи [23, 69, 75]. Таким образом, внутри клетки могут образовываться зрелые вирионы, возможно, даже до того, как Е2 перейдет на плазматическую мембрану и сделает клетку чувствительной к иммунному воздействию. В сущности, покрытые оболочкой вирусы этого типа почкуются в месте, которое не подвергается действию иммунной защиты хозяина. Возможно, именно этим объясняется персистенция коронавирусов в хозяине, обладающем иммунитетом.

Некоторые вирионы могут выходить из клетки лишь при ее гибели, однако коронавирусы способны выходить также из интактных клеток, по-видимому, с помощью механизма клеточной секреции [35, 104]. После того как вирионы пройдут через аппарат Гольджи, где происходит гликозилирование Е2 с присоединением олигосахаридов О- и N-гликозидными связями, ацилирование и, возможно, протеолитическое расщепление этого белка, они переходят в гладкие пузырьки (везикулы). Эти везикулы мигрируют к краю клетки, где сливаются с плазматической мембраной, в результате чего во внеклеточное пространство выходит большое количество вирионов. Способность коронавирусов выходить из клетки без ее лизиса является важным фактором,

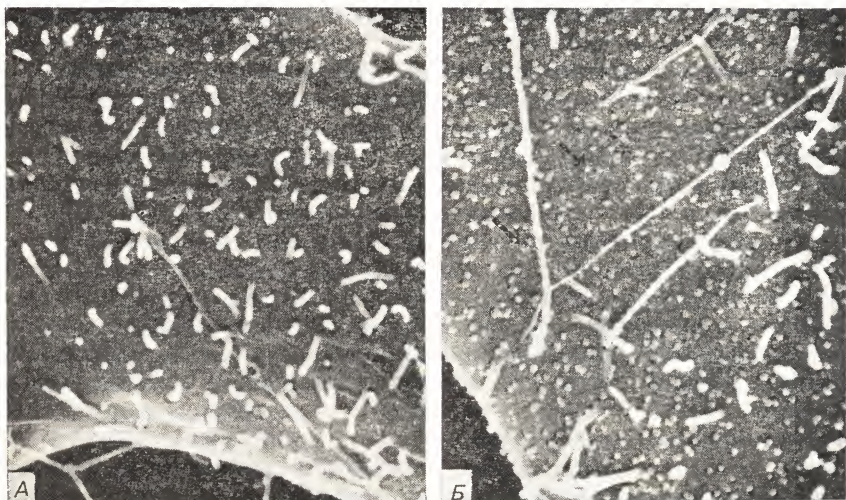


Рис. 25.6. Полученные при помощи сканирующего электронного микроскопа микрофотографии поверхностей незараженной клетки и клетки, зараженной MNV. Контрольная клетка (А) имеет гладкую плазматическую мембрану, покрытую многочисленными цилиндрическими микроворсинками. В зараженной клетке (Б) с плазматической мембраной и микроворсинками связано большое число сферических вирионов коронавируса. Такие прикрепленные к мембране вирионы вместе с молекулами Е2 могут участвовать в индуцированном коронавирусом слиянии клеток и делают зараженные клетки чувствительными к действию иммунозащитных факторов хозяина.  $\times 10\,300$ . (Из [21], с разрешения.)

обеспечивающим возможность умеренной (нецитопатической) инфекции.

Характерно, что на плазматической мембране зараженных клеток можно видеть большое количество вирионов коронавируса [75] (рис. 25.6). Эти вирионы не почкуются от плазматической мембраны, а, по-видимому, адсорбировались на ней уже после выхода из зараженных клеток. Причина такого удивительного концентрирования вирионов неизвестна; во всяком случае, вирусы, находящиеся на поверхности зараженной клетки, могут в принципе стимулировать иммунный ответ хозяина и принимать участие в процессе слияния клеток.

## Заключение

Темпы исследования коронавируса в последнее время заметно ускорились, быстрый прогресс в этой области можно ожидать и в будущем. В настоящее время разработаны методы выращивания в большом количестве и очистки некоторых коро-



навирусов, методики разделения вирусных структурных белков и анализа вирусной РНК-полимеразы. Клонирование генов должно в скором времени привести к решению наиболее важных вопросов, касающихся репликации коронавирусов. Например, какими свойствами обладают неструктурные белки? Как узнается место начала синтеза РНК и как регулируется синтез мРНК? Как лидерная РНК присоединяется к цепям мРНК? Что определяет относительное количество минус- и плюс-цепей РНК, синтезирующихся в зараженных клетках? Для изучения структуры, антигенных свойств, процессинга, внутриклеточного переноса и сборки вирусных белков начинают применять новые иммунологические методики, в том числе моноклональные антитела [20, 108]. В сочетании с экспрессией клонированных генов моноклональные антитела могут стать ценным подспорьем при разработке новых чувствительных тестов для медицинских целей. Наконец, при помощи обычного или сайт-специфического мутагенеза получают мутантные формы коронавирусов [28, 43, 78], которые чрезвычайно полезны при изучении репликации и вирулентности этих вирусов.

#### Литература

1. Andries K., Pensaert M. B. (1981). Vomiting and wasting disease. A coronavirus infection of pigs, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **142**, 399—408.
2. Armstrong J., Smeekens S., Rottier P. (1983) Sequence of the nucleocapsid gene from coronavirus MHV-A59, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 883—891.
3. Armstrong J., Smeekens S., Spaan W., Rottier P., van der Zeist B. (1984). Cloning and sequencing the nucleocapsid and E1 genes of coronavirus MHV-A59, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **173**, 155—162.
4. Bang F. B. (1981). The use of a genetically incompatible combination of host and virus (MHV) for the study of mechanisms of host resistance, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **142**, 359—370.
5. Bang F. B., Warwick A. (1960) Mouse macrophage as host cells for the mouse hepatitis virus and the genetic basis of their susceptibility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **46**, 1065—1075.
6. Baric R. S., Stohlman S. A., Lai M. M. C. (1983). Characterization of replicative intermediate RNA of mouse hepatitis virus: Presence of leader RNA sequences on nascent chains, *J. Virol.*, **48**, 633—640.
7. Barthold S. W., Smoth A. L. (1984) Mouse hepatitis virus strain-related patterns of tissue tropism in suckling mice, *Arch. Virol.* (in press).
8. Barthold S. W., Smith A. L., Lord P. F. S., Bhatt P. N., Jacoby R. O., Main A. J. (1982). Epizootic coronaviral typhlocolitis in suckling mice, *Lab. Animal Sci.*, **32**, 376—383.
9. Berry D. M., Cruicktank J. G., Chu H. P., Dells R. H. J. (1964). The structure of infectious bronchitis virus, *Virology*, **23**, 403—407.
10. Bradburne A. F., Bynoe M. L., Tyrrell D. A. J. (1967). Effects of a «new» human respiratory virus in volunteers, *Br. Med. J.*, **3**, 767—769.
11. Brayton P. R., Lai M. M. C., Patton C. D., Stohlman S. A. (1982). Characterization of two RNA polymerase activities induced by mouse hepatitis virus, *J. Virol.*, **42**, 847—853.
12. Burks J. S., DeVald B. D., Jankovsky L. C., Gerdes J. C. (1980). Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients, *Science*, **209**, 933—934.

13. *Caul E. O., Egglestone S. I.* (1977). Further studies on human enteric coronaviruses, *Arch. Virol.*, **54**, 107—117.
14. *Caul E. O., Paver W. K., Clarke S. K. R.* (1975). Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis, *Lancet*, **1**, 1192.
15. *Caul E. O., Ashley C. R., Ferguson M., Egglestone S. I.* (1979). Preliminary studies on the isolation of coronavirus 229E nucleocapsids, *FEMS Microbiol., Lett.*, **5**, 101—105.
16. *Cavanagh D.* (1983). Coronavirus IBV: Structural characterization of the spike glycoprotein, *J. Gen. Virol.*, **64**, 2577—2583.
17. *Cavanagh D.* (1984). Structural characterization of infectious bronchitis virus glycoproteins, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **173**, 95—108.
18. *Chaloner-Larson G., Johnson-Lussenburg C. M.* (1982). Characteristics of a long-term in vitro persistent infection with human coronavirus 229E, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **142**, 309—322.
19. *Clarke S. K. R., Caul E. O., Egglestone S. E.* (1979). The human enteric coronaviruses, *Postgrad. Med. J.*, **55**, 135—142.
20. *Collins A. R., Knobler R. L., Powell H., Buchmeier M. J.* (1982). Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus 4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion, *Virology*, **119**, 358—371.
21. *David-Ferreira J. F., Manaker R. A.* (1965). An electron microscope study of the development of a mouse hepatitis virus in tissue culture cells, *J. Cell Biol.*, **24**, 57—78.
22. *Dubois-Dalcq M. E., Holmes K. V., Rentier B.* (1984). Budding of Enveloped RNA Viruses, Chapter 7, Vienna, Springer-Verlag (in press).
23. *Dubois-Dalcq M. E., Doller E. W., Haspel M. V., Holmes K. V.* (1982). Cell tropism and expression of mouse hepatitis viruses (MHV) in mouse spinal cord cultures, *Virology*, **119**, 317—331.
24. *Estes M. K., Graham D. X., Mason B. B.* (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: Molecular mechanisms, *J. Virol.*, **39**, 879—888.
25. *Fleming J. O., Stohlman S. A., Harmon R. C., Lai M. M. C., Frelinger J. A., Weiner L. P.* (1983). Antigenic relationship of murine coronaviruses: Analysis using monoclonal antibodies to JHM (MHV-4) virus, *Virology*, **131**, 296—307.
26. *Garwes D. J., Pocock D. H., Pike B. V.* (1976). Isolation of subviral components from transmissible gastroenteritis virus, *J. Gen. Virol.*, **32**, 283—294.
27. *Gerdes J. C., Klein I., De Vald B. L., Burks J. S.* (1981). Coronavirus isolates SK and SD from multiple sclerosis patients are serologically related to murine coronaviruses A59 and JHM and human coronavirus OC43, but not to human coronavirus 229E, **38**, 231—238.
28. *Haspel M. V., Lampert P. W., Oldstone M. B.* (1978). Temperature-sensitive mutants of mouse hepatitis virus produce a high incidence of demyelination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4033—4036.
29. *Helenius A., Marsh M., White J.* (1980). The entry of viruses into animal cells, *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 104—106.
30. *Herndon R. M., Griffin D. E., McCormick U., Weiner L. P.* (1975). Mouse hepatitis virus-induced recurrent demyelination, *Arch. Neurol.*, **32**, 32—35.
31. *Holmes K. V.* (1981). The biology and biochemistry of cellular receptors for enveloped viruses. In: *Virus Receptors*, Part 2, *Animal Viruses*, ed. by K. Lonberg-Holm and L. Philipson, London, Chapman and Hall.
32. *Holmes K. V., Behnke J. N.* (1981). Evolution of a coronavirus during persistent infection in vitro, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **142**, 287—299.
33. *Holmes K. V., Doller E. W., Behnke J. N.* (1981). Analysis of the functions of coronavirus glycoproteins by differential inhibition of synthesis with tunicamycin, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **142**, 133—142.

34. Holmes K. V., Doller E. W., Sturman L. S. (1981). Tunicamycin resistant glycosylation of a coronavirus glycoprotein: Demonstration of a novel type of viral glycoprotein, *Virology*, **115**, 334—344.
35. Holmes K. V., Frana M. F., Robbins S. G., Sturman L. S. (1984). Coronavirus replication. In: *Molecular biology and Pathogenesis in Coronaviruses*, ed. by P. J. M. Rottier, B. A. M. van der Zeijst, W. J. M. Spaan, and M. Horzinek, Plenum, New York (in press).
36. Hoshino Y., Scott F. W. (1980). Coronavirus-like particles present in the feces of normal cats, *Arch. Virol.*, **63**, 147—152.
37. Johnson D. C., Spear P. G. (1983). O-linked oligosaccharides are acquired by herpes simplex virus glycoproteins in the Golgi apparatus, *Cell*, **32**, 987—997.
38. Kaye H. S., Dowdle W. R. (1969). Some characteristics of hemagglutination of certain strains of «IBV-like» virus, *J. Infect. Dis.*, **120**, 576—581.
39. Klenk H. D., Rott R. (1981). Cotranslational and posttranslational processing of viral glycoproteins, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **90**, 19—48.
40. Knobler R. L., Haspel M. V., Oldstone M. B. A. (1981). Mouse hepatitis virus type 4 (JHM strain) induced fatal nervous system disease. 1. Genetic control and the murine neuron as the susceptible site of disease, *J. Exp. Med.*, **133**, 832—843.
41. Knobler R. L., Lampert P. W., Oldstone M. B. A. (1982). Virus persistence and recurring demyelination produced by a temperature-sensitive mutant of MHV-4, *Nature (Lond.)*, **298**, 279—280.
42. Knobler R. L., Dubois-Dalq M., Haspel M. V., Claysmith A. P., Lampert P. W., Oldstone M. B. A. (1981). Selective localization of wild-type and mutant mouse hepatitis virus (JHM strain) antigens in CNS tissue by fluorescence, light and electron microscopy, *J. Neuroimmunol.*, **1**, 81—92.
43. Koolen M. J. M., Osterhaus D. M. E., van Steenis G., Horzinek M. C., van der Zeijst B. A. M. (1983). Temperature-sensitive mutants of mouse hepatitis virus strain A59: Isolation, characterization and neuropathogenic properties, *Virology*, **125**, 393—402.
44. Lai M. M. C., Stohlmán S. A. (1978). The RNA of mouse hepatitis virus, *J. Virol.*, **26**, 236—242.
45. Lai M. M. C., Stohlmán S. A. (1981). Comparative analysis of RNA genomes of mouse hepatitis viruses, *J. Virol.*, **38**, 661—670.
46. Lai M. M. C., Patton C. D., Stohlmán S. A. (1982). Replication of mouse hepatitis virus: Negative-stranded RNA and replicative form RNA are of genome length, *J. Virol.*, **44**, 487—492.
47. Lai M. M. C., Patton C. D., Stohlmán S. A. (1982). Further characterization of mouse hepatitis virus: Presence of common 5'-end nucleotides, *J. Virol.*, **41**, 557—565.
48. Lai M. M. C., Baric R. S., Brayton P. R., Stohlmán S. A. (1984). Studies of the mechanism of RNA synthesis of a murine coronavirus, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **173**, 187—200.
49. Lai M. M. C., Patton C. D., Baric R. S., Stohlmán S. A. (1983). Presence of leader sequences in the mRNA of mouse hepatitis virus, *J. Virol.*, **46**, 1027—1033.
50. Lai M. M. C., Brayton P. R., Armen R. C., Patton C. D., Pugh C., Stohlmán S. A. (1981). Mouse hepatitis virus A59 messenger RNA structure and genetic localization of the sequence divergence from the hepatropic strain MHV3, *J. Virol.*, **39**, 823—834.
51. Larson H. E., Reed S. E., Tyrrell D. A. J. (1980). Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 colds in adults, *J. Med. Virol.*, **5**, 221—229.
52. Leibowitz J. L. (1983). Personal communication.
53. Leibowitz J. L., DeVries J. R., Haspel M. V. (1982). Genetic analysis of murine hepatitis virus strain JHM, *J. Virol.*, **42**, 1080—1087.



54. Leibowitz J. L., Wilhelmsen K. C., Bond C. W. (1981). The virus-specific intracellular RNA species of two murine coronaviruses: MHV-JHM, *Virology*, **114**, 29—51.
55. Leibowitz J. L., Weiss S. R., Paavola E., Bond C. W. (1982). Cell-free translation of murine coronavirus RNA, *J. Virol.*, **43**, 905—913.
56. LePrevost C., Virelizier J. L., Dupuy J. M. (1975). Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. III. Clinical and virologic observation of a persistent viral infection, *J. Immunol.*, **115**, 640—645.
57. Lomniczi B. (1977). Biological properties of avian coronavirus RNA, *J. Gen. Virol.*, **36**, 531—533.
58. Lucas A., Coulter M., Anderson R., Dales S., Flintoff W. (1978). In vivo and in vitro models of demyelinating diseases: Persistence and host-regulated thermosensitivity in cells of neural derivation infected with mouse-hepatitis virus and measles viruses, *Virology*, **88**, 325—337.
59. McIntosh K. (1974). Coronaviruses. A comparative review, *Curr. Top. Microbiol.*, **63**, 85—129.
60. McIntosh K., Dees H. J., Becker W. B., Kapikian A. Z., Chanock R. M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 933—940.
61. McIntosh K., Kapikian A. Z., Hardison K. A., Hartley J. W., Chanock R. M. (1969). Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses, *J. Immunol.*, **102**, 1109—1118.
62. McIntosh K., Chao R. K., Krause H. E., Wasil R., Mocega H. E., Mufson M. A. (1974). Coronavirus infection in acute lower respiratory tract disease of infants, *J. Infect. Dis.*, **139**, 502—510.
63. McIntosh K., Kapikian A. Z., Turner H. C., Hartley J. W., Parrot R. H., Chanock R. M. (1970). Seropidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children, *Am. J. Epidemiol.*, **91**, 585—592.
64. Macnaughton M. R. (1982). Structural and antigenic relationships between human, murine and avian coronaviruses, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **142**, 19—28.
65. Macnaughton M. R., Davies H. A. (1981). Human enteric coronaviruses: Brief review, *Arch. Virol.*, **70**, 301—313.
66. Macnaughton M. R., Davies H. A., Nermut M. V. (1978). Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles, *J. Gen. Virol.*, **39**, 545—549.
67. Macnaughton M. R., Hasony H. J., Madge M. H., Reed S. E. (1981). Antibody to virus components in volunteers experimentally infected with human coronavirus 229E group viruses, *Infect. Immunol.*, **31**, 845—849.
68. Mallucci L. (1966). Effect of chloroquine on lysosomes and on growth of mouse hepatitis virus (MHV-3), *Virology*, **28**, 355—362.
69. Massalski A., Coulter-Mackie M., Knobler R. L., Buchmeier M. L., Dales S. (1982). In vivo and in vitro models of demyelinating diseases. V. Comparison of the assembly of mouse hepatitis virus, strain JHM, in two murine cell lines, *Intervirology*, **18**, 135—146.
70. Mengeling W. L., Booth A. D., Ritchie A. E. (1972). Characteristics of a coronavirus (strain 67N) of pigs, *Am. J. Vet. Res.*, **33**, 297—300.
71. Moscovici O., Chany C., Lebon P., Rousset S., Laporte J. (1980). Association d'infection a coronavirus avec l'enterocolite hemorragique du nouveau-ne, *C. R. Acad. Sci. [D] (Paris)*, **290**, 869—872.
72. Niemann H., Klenk H.-D. (1981). Coronavirus glycoprotein E1, a new type of viral glycoprotein, *J. Mol. Biol.*, **153**, 993—1010.
73. Niemann H., Boschek B., Evans D., Rosing M., Tamura T., Klenk H.-D. (1982). Post-translational glycosylation of corona virus glycoprotein E1: Inhibition by monensin, *EMBO J.*, **1**, 1499—1504.
74. Olofsson S., Blomberg J., Lycke E. (1981). O-glycosidic carbohydrate-peptide linkages of herpes simplex virus glycoproteins, *Arch. Virol.*, **70**, 321—329.

75. Oshiro L. S. (1973). Coronaviruses. In: *Ultrastructure of Animal Viruses and Bacteriophages: An Atlas*, ed. by A. J. Dalton and F. Haguénau, Chapter 18, pp. 331—343, Academic Press, New York.
76. Pedersen N. C., Ward I., Mengening W. L. (1978). Antigenic relationships of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species, *Arch. Virol.*, **58**, 45—53.
77. Riski H., Hovi T. (1980). Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold, *J. Med. Virol.*, **6**, 259—265.
78. Robb J. A., Bond C. W., Leibowitz J. L. (1979). Pathogenic murine coronaviruses. III. Biological and biochemical characterization of temperature-sensitive mutants of JHMV, *Virology*, **91**, 385—399.
79. Rottier P. J. M., Spaan W. J. M., Horzinek M., van der Zeijst B. A. M. (1981). Translation of three mouse hepatitis virus (MHV-A59) subgenomic RNAs in *Xenopus laevis* oocytes, *J. Virol.*, **38**, 20—26.
80. Rottier P. J. M., Vrandenburg P., Armstrong J., van der Zeist B. A. M., Warren G. (1984). In vitro assembly of the murine coronavirus membrane protein E1, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **173**, 53—64.
81. Sabesin S. M. (1971). The role of lysosomes in the pathogenesis of experimental viral hepatitis, *Am. J. Gastroenterol.*, **55**, 539—563.
82. Schmidt M. F. G. (1982). Acylation of viral spike glycoproteins, a feature of enveloped RNA viruses, *Virology*, **116**, 327—338.
83. Schochetman G., Stevens R. H., Simpson R. W. (1977). Presence of infectious polyadenylated RNA in the coronavirus avian infectious bronchitis virus, *Virology*, **77**, 772—782.
84. Shida H., Dales S. (1981). Biogenesis of vaccinia: Carbohydrate of the hemagglutinin molecule, *Virology*, **111**, 56—72.
85. Siddell S. G. (1983). Coronavirus JHM: Coding assignments of subgenomic mRNAs, *J. Gen. Virol.*, **64**, 113—125.
86. Siddell S. G., Barthel A., ter Meulen V. (1981). Coronavirus JHM. A virion-associated protein kinase, *J. Gen. Virol.*, **52**, 235—243.
87. Siddell S. G., Wege H., ter Meulen V. (1982). The structure and replication of coronaviruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **99**, 131—163.
88. Siddell S. G., Wege H., ter Meulen V. (1983). The biology of coronaviruses, *J. Gen. Virol.*, **64**, 761—776.
89. Siddell S. G., Anderson R., Cavanagh D., Fujiwara K., Klenk H. D., Macnaughton M. R., Pensaert M., Stohlman S. O., Sturman L., van der Zeijst B. A. M. (1983). Coronaviridae, *Intervirology*, **20**, 181—189.
90. Skinner M. A., Siddell S. G. (1983). Coronavirus JHM: Nucleotide sequence of the mRNA that encodes nucleocapsid protein, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 883—891.
91. Spaan W. J. M., Rottier P. J. M., Horzinek M. C., van der Zeijst R. A. M. (1982). Sequence relationships between the genome and the intracellular RNA species 1, 3, 6, and 7 of mouse hepatitis virus strain A59, *J. Virol.*, **42**, 432—439.
92. Spaan W., Delius H., Skinner M., Armstrong J., Rottier P., Smeekens S., van der Zeijst B. A. M., Siddell S. G. (1983). Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of noncontiguous sequences, *EMBO J.*, **2**, 1839—1844.
93. Stern D. F., Kennedy S. I. T. (1980). Coronavirus multiplication strategy. I. Identification and characterization of virus specified RNA, *J. Virol.*, **34**, 665—674.
94. Stern D. F., Kennedy S. I. T. (1980). Coronavirus multiplication strategy. II. Mapping the avian infectious bronchitis virus intracellular RNA species to the genome, *J. Virol.*, **36**, 440—449.
95. Stern D. F., Sefton B. M. (1982). Coronavirus proteins: Biogenesis of avian infectious bronchitis virus virion proteins, *J. Virol.*, **44**, 794—803.

96. Stern D. F., Sefton B. M. (1982). Coronavirus proteins: Structure and functions of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins, *J. Virol.*, **44**, 804—812.
97. Stohlgman S. A., Frelinger J. A. (1978). Resistance to fatal central nervous system disease by mouse hepatitis virus strain JHM. 1. Genetic analysis, *Immunogenetics*, **6**, 277—281.
98. Stohlgman S. A., Lai M. M. C. (1979). Phosphoproteins of murine hepatitis viruses, *J. Virol.*, **32**, 672—675.
99. Stohlgman S. A., Fleming J. O., Patton C. D., Lai M. M. C. (1983). Synthesis and subcellular localization of the murine coronavirus nucleocapsid protein, *Virology*, **130**, 527—532.
100. Storz J., Rott R., Kaluza G. (1981). Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment, *Infect. Immunol.*, **31**, 1214—1222.
101. Strauss E. G., Strauss J. H. (1983). Replication strategies of the single stranded RNA viruses of eukaryotes, *Curr. Topics. Microbiol. Immunol.*, **105**, 1—98.
102. Sturman L. S. (1981). The structure and behaviour of coronavirus A59 glycoproteins, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **142**, 1—18.
103. Sturman L. S., Holmes K. V. (1977). Characterization of a coronavirus. II. Glycoproteins of the viral envelope: Tryptic peptide analysis, *Virology*, **77**, 650—660.
104. Sturman L. S., Holmes K. V. (1983). The molecular biology of coronaviruses, *Adv. Virus Res.*, **28**, 35—112.
105. Sturman L. S., Holmes K. V. (1984). Proteolytic cleavage of peplomeric glycoprotein E2 of MHV yields two 90 K subunits and activates cell fusion. In: *Molecular Biology and Pathogenesis of Coronaviruses* (in press).
106. Sturman L. S., Takemoto K. K. (1972). Enhanced growth of a murine coronavirus in transformed mouse cells, *Infect. Immunol.*, **6**, 501—507.
107. Sturman L. S., Holmes K. V., Behnke J. (1980). Isolation of a coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid, *J. Virol.*, **33**, 449—462.
108. Talbot P. J., Salmi A. A., Knobler R. L., Buchmeier M. J. (1984). Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): Correlation with biological activities, *Virology*, **132** (in press).
109. Tanaka R., Twaskai Y., Koprowski H. (1976). Intracisternal virus-like particles in brain of multiple sclerosis patient, *J. Neurol. Sci.*, **28**, 121—126.
110. Taylor C. E., Weiser W. Y., Bang F. B. (1981). In vitro macrophage manifestation of cortisone-induced decrease in resistance to mouse hepatitis virus, *J. Exp. Med.*, **153**, 732—737.
111. Tyrrell D. A. J., Almeida J. D. (1967). Direct electron microscopy of organ cultures for the detection and characterization of viruses, *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **22**, 417—425.
112. Tyrrell D. A. J., Bynoe M. L. (1965). Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ culture, *Br. Med. J.*, **1**, 1467—1470.
113. Tyrrell D. A. J., Almeida J. D., Berry D. M., Cunningham C. H., Hamre D., Hofstad M. S., Mallucci L., McIntosh K. (1968). Coronaviruses, *Nature (Lond.)*, **220**, 650.
114. Tyrrell D. A. J., Alexander D. J., Almeida J. D., Cunningham C. H., Easterday B. C., Garwes D. J., Hierholzer J. C., Kapikian A., Macnaughton M. R., McIntosh K. (1978). Coronaviridae: 2nd report, *Intervirology*, **10**, 321—328.
115. Tyrrell D. A. J., Almeida J. D., Cunningham C. H., Dowdle W. R., Hofstad M. S., McIntosh K., Tejima M., Zakstelskaya L. Y. A., Easterday B. C., Kapikian A., Bingham R. W. (1975). Coronaviridae, *Intervirology*, **5**, 76—82.

116. Ward J. M., Gribble D. H., Dungworth D. L. (1974). Feline infectious peritonitis: Experimental evidence for its multiphasic nature, *Am. J. Vet. Res.*, **35**, 1271—1275.
117. Wege H., Siddell S., ter Meulen V. (1982). The biology and pathogenesis of coronaviruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **99**, 165—200.
118. Wege H., Siddell S., Sturm M., ter Meulen V. (1981). Coronavirus JHM: Characterization of intracellular viral RNA, *J. Gen. Virol.*, **54**, 213—217.
119. Weiner L. P. (1973). Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis virus (JHM virus), *Arch. Neurol.*, **28**, 293—303.
120. Weiss S. (1983). Coronaviruses SD and SK share extensive nucleotide homology with murine coronavirus MHV-A59 more than that shared between human and murine coronaviruses, *Virology*, **126**(2), 669—677.
121. Welsh R. M., Biron C. A., Parker D. C., Bukowski J. F., Habu S., Okumura K., Haspel M. V., Holmes K. V. (1983). Regulation and role of natural cell mediated immunity during virus infection. In: *Human Immunity to Viruses*, ed. by E. A. Ennis, pp. 21—42, New York, Academic Press.
122. Werdin R. E., Sorensen D. K., Stewart M. S. (1976). Porcine encephalomyelitis caused by hemagglutinating encephalomyelitis virus, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **168**, 240—246.
123. Wilhelmsen K. C., Leibowitz J. L., Bond C. W., Robb J. A. (1981). The replication of murine coronaviruses in enucleated cells, *Virology*, **110**, 225—230.
124. Yoshikura H., Tejima S. (1981). Role of proteins in MHV-induced cell fusion, *Virology*, **113**, 503—511.



## Репликация папавирусов

*Дэвид М. Ливингстон, Илан Бикел<sup>1</sup>*

Семейство папавирусов состоит из нескольких вирусов: обезьяньего вируса 40 (SV40) [177], вируса полиомы мышей (PY) [177], двух человеческих видов — вирусов BK и FC [177], вируса хомячков [146], лимфотропного вируса В обезьян [182] и папилломавирусов. Поскольку данная глава посвящена анализу механизмов репликации и регуляции экспрессии геномов этих вирусов, основное внимание будет уделено тому, что известно по этому вопросу для SV40 и вируса полиомы, двух наиболее хорошо изученных членов этой группы.

SV40 был вначале охарактеризован как литический вирус, для которого единственными полностью перmissive клетками-хозяевами были клетки обезьян. Хотя клетки человека заражаются SV40 и в них может протекать синтез вирусной ДНК, в целом они не столь эффективны, как клетки макака-резуса или зеленой африканской мартышки, поскольку в них не происходит интенсивного образования инфекционного вируса. Некоторые клетки хомячков полуперmissive для SV40, однако они, по-видимому, еще менее эффективны, чем клетки человека. Для вируса полиомы единственными известными полностью перmissive хозяевами являются мышинные клетки.

Заражение SV40 или вирусом PY некоторых неперmissive клеток-хозяев может приводить к образованию клонов трансформированных клеток. Вероятность трансформации таких неперmissive клеток вирусами SV40 или PY дикого типа обычно составляет менее 2—3%, а часто и еще меньше (например,  $\leq 0,5\%$ ), причем даже в случае высокой множественности заражения. Таким образом, оба агента лишь с малой эффективностью вызывают возникновение стабильного опухолевого фенотипа у зараженной клетки. Некоторые рассуждения о возможной причине (или причинах) этого явления даются в следующем разделе данной главы.

Трансформированные вирусом клетки обычно содержат одну или несколько копий вирусной ДНК, причем эта ДНК обычно

---

<sup>1</sup> David M. Livingston, Ilan Bikel, Dana-Farber Cancer Institute and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115.



включает специфическую часть вирусного генома, которая детерминирует белковые продукты, вызывающие трансформацию клеток (ранняя область). Структура интегрированных участков вирусного генома подробно изучена, что дает возможность выяснить некоторые детали механизма интеграции. Этот вопрос также рассматривается в этой главе.

Поскольку нет никаких данных о том, что SV40 вызывает *in vivo* опухоли у макаков-резусов, его выживание в клетках этих хозяев в значительной степени зависит от его способности к репликации и(или) к существованию в латентной форме в зараженных клетках, а также, возможно, к переносу между особями. Таким образом, продукты тех вирусных генов, которые участвуют в опухолевой трансформации клеток и индукции опухолей у животных, зараженных в лабораторных условиях, возможно, сформировались в ходе эволюции, потому что они обеспечивали выживание вируса в природной среде. Принимая во внимание такую возможность, полагают, что те химические механизмы, которые определяют вирусную персистенцию и(или) репликацию, тесно связаны с механизмами, вызывающими и поддерживающими опухолевую трансформацию.

## Структура вирионов и начало инфекции

Геном SV40 представляет собой сверхспиральную двухцепочечную молекулу ДНК длиной 5243 bp, которая и в зараженных перmissive клетках, и в вирионе представлена в виде хроматина (мини-хромосомы). Геном вируса РУ содержит 5292 bp и имеет сходное с SV40 физическое строение как в отношении ДНК, так и в отношении хроматина. Хорошо изученные мини-хромосомы SV40 и вируса РУ содержат ~24 нуклеосомы. Каждая нуклеосома содержит четыре клеточных гистона, H2a, H2b, H3 и H4, тогда как гистон H1 отсутствует [177]. У этих двух вирусов [8, 128], а также у вируса ВК (ВКВ) [150, 181] определены нуклеотидные последовательности всего генома.

Геномы SV40 и вируса РУ содержат единственное место, где начинается репликация ДНК. Обе ДНК состоят из двух транскрибирующихся областей: ранней и поздней. Их упрощенные физические карты представлены на рис. 26.1.

Литическая инфекция и SV40, и вируса РУ начинается с прикрепления вириона к поверхности клетки. Почти половина добавленных вирусов адсорбируется монослоем клеток за 60—120 мин [118]. Как показано с помощью электронной микроскопии, вирионы проникают в клетку, по-видимому, посредством пиноцитоза [107]. Проникновение в клетку также происходит

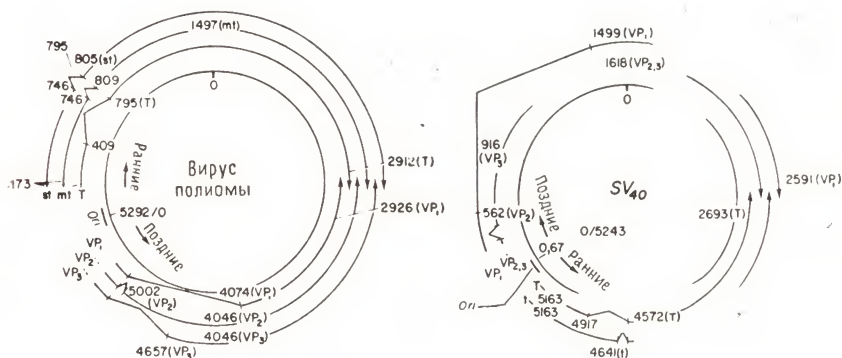


Рис. 26.1. Физические, транскрипционные и трансляционные карты геномов вируса РУ и SV40. mt — средний Т-антиген, st — малый Т-антиген; Т — большой Т-антиген. (Рисунки приведены с разрешения авторов и издательства из [177].)

быстро, поскольку спустя 30—60 мин после заражения интактные вирионы можно наблюдать в ядре. Есть основания предполагать, что перенос вирионов в ядро осуществляется с помощью везикул. В цитоплазме вирионы обнаруживаются именно в везикулах. Разделение вирионов и основные процессы их сборки происходят в ядре.

Известны четыре вирионных белка: VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> и один неохарактеризованный белок [82]. Локализация и структура их генов приведены на рис. 26.1. Белок VP<sub>1</sub>, мол. масса которого  $\approx 45$  К, является основным белковым компонентом вирионов. Белки VP<sub>2</sub> и VP<sub>3</sub> содержатся в вирионе в меньших количествах, они кодируются в значительной степени одной и той же нуклеотидной последовательностью, правда,  $\sim 35\%$  последовательности, соответствующие N-концевой части белка VP<sub>2</sub>, являются уникальными. На температурочувствительных мутантах по генам VP<sub>1</sub> и VP<sub>2</sub>/VP<sub>3</sub> изучали их поведение во время литического цикла [177]. В частности, оказалось, что некоторые мутации в гене VP<sub>1</sub> влияют на сборку и стабильность вирионов. Некоторые мутации по VP<sub>2</sub>/VP<sub>3</sub> влияют на очень ранние функции, по-видимому, на процесс раздевания, детали которого в настоящее время еще мало изучены. Белок VP<sub>1</sub> относится к фосфопротейнам, причем есть данные, свидетельствующие о множественности участков фосфорилирования [115]. Роль четвертого белка в настоящее время неизвестна, однако в ряде исследований показано, что он принимает участие в регуляции транскрипции поздних генов и(или) в процессинге РНК [10].

## Экспрессия ранних генов и функция их продуктов

После раздевания вируса и до начала синтеза вирусной ДНК начинается экспрессия ранней транскрипционной единицы длиной около 2500 бр. Ранние промоторы находятся на участке начала репликации: их структура подробно обсуждается ниже в этой главе. Вскоре начинается синтез вирусной ДНК и одновременно интенсивная транскрипция оставшихся ~2500 бр (поздняя транскрипционная единица). Транскрипция ранней области продолжается и в течение поздней стадии жизненного цикла. Имеются данные, что поздний участок также транскрибируется в начале цикла, правда, при этом не синтезируются зрелые поздние мРНК [46, 119]. Регуляцию переключения ранней и поздней транскрипции мы обсудим в этой главе ниже.

Как показано на рис. 26.1, продуктами экспрессии ранней области SV40 являются: большой Т-антиген — полифункциональный фосфопротеин с мол. массой 81 К, находящийся главным образом в ядре [123] и частично включенный в плазматическую мембрану [36, 65, 140, 157, 172], и малый Т-антиген — нефосфорилированный белок с мол. массой 20 К, присутствующий и в ядре, и в цитоплазме зараженных клеток [43, 124]. 82 аминокислотных остатка на N-концах этих белков идентичны, что обусловлено частичным перекрыванием участков, кодирующих эти белки. В случае вируса РУ имеются три ранних белка — большой, малый и средний Т-антигены. Структура цистронов этих белков также представлена на рис. 26.1. Важно отметить, что большой, средний и малый Т-антигены вируса РУ имеют 79 общих аминокислотных остатков на N-конце; кроме того, у среднего и малого Т-антигенов идентичны 191 остаток на N-конце. Таким образом, средний Т-антиген вируса РУ содержит почти всю аминокислотную последовательность малого Т-антигена. По своим размерам, характеру фосфорилирования и местам локализации в клетке большой и малый Т-антигены вируса РУ аналогичны большому и малому Т-антигенам SV40 [86, 177], хотя пока неизвестно, содержатся ли в плазматической мембране хотя бы несколько молекул большого Т-антигена вируса РУ. Напротив, фосфорилированный средний Т-антиген входит в состав плазматической мембраны, причем во внешнюю среду экспонируется лишь небольшая часть его молекулы. Косвенные иммунофлуоресцентные данные свидетельствуют о том, что некоторая часть молекул среднего Т-антигена концентрируется в эндоплазматическом ретикулуме [39].

Как будет обсуждаться позднее, и для SV40, и для вируса РУ показано, что большой Т-антиген играет важную роль в литическом цикле. В отличие от него ни один из других ранних



белков не является абсолютно необходимым для этого процесса в культивируемых клетках, хотя средний Т- и (или) малый Т-антигены вируса РУ усиливают репликацию вирионов в некоторых (но не во всех) линиях клеток [47]. Это свойство получило название «феномен спектра хозяев», и, по-видимому, оно проявляется на поздней фазе жизненного цикла вируса [159].

При заражении чувствительных непермиссивных клеток перевиваемых линий вирусами РУ или SV40 действие большого Т-антигена приводит к опухолевой трансформации [177]. По-видимому, это эквивалентно стабилизации в таких клетках функционирующего вирусного генома. На основании косвенных данных высказано предположение, что действие большого Т-антигена (возможно, непрямым путем) приводит к интеграции вирусного генома при помощи механизма неспецифической «незаконной» рекомбинации [177].

При некоторых условиях у SV40 действие и большого, и малого Т-антигенов необходимо для поддержания опухолевого фенотипа [11, 16, 22, 49, 103, 104, 117, 133, 153, 156, 167], а у вируса РУ эту функцию выполняют средний Т-антиген и N-концевая половина большого Т-антигена [126]. Обычно линии клеток, полностью трансформированные SV40 или вирусом РУ дикого типа, растут на агаре при низкой концентрации сыворотки. В отличие от этого клетки некоторых перевиваемых линий после трансфекции плазмидой, экспрессирующей только средний Т-антиген, ведут себя как полностью трансформированные, лишь когда растут при достаточно высоких концентрациях сыворотки [126]. Оказывается, что для полной трансформации в среде с низким содержанием сыворотки клеткам требуется ~40% аминокислотной последовательности (с N-конца) большого Т-антигена [126]. Следовательно, действие этого фрагмента большого Т-антигена может приводить к уменьшению потребности клеток в экзогенном полипептидном факторе роста, содержащемся в сыворотке; в противном случае клетки приобретают другие опухолевые свойства, контролируемые средним Т-антигеном. В культивируемых первичных клетках действие больших Т-антигенов обоих вирусов, как SV40, так и вируса РУ, может приводить к иммортализации клеток, которые иначе подвергались бы процессу старения [25, 120, 126]. Средний Т-антиген в этом отношении неактивен. Следовательно, способность к неограниченному росту трансформированных вирусами SV40 и РУ опухолевых клеток может также определяться свойствами большого Т-антигена. Кроме того, имеются четкие доказательства, что в некоторых условиях N-концевая половина большого Т-антигена SV40 способна поддерживать трансформацию (в присутствии или в отсутствие малого Т-антигена) [24, 25]. Таким образом, большой Т-антиген SV40 имеет участки, которые не нужны

для поддержания трансформации, что согласуется со многими другими фактами, свидетельствующими о полифункциональности этого белка.

Если в случае SV40 для трансформации обычно требуется фрагмент большого Т-антигена, то для вируса РУ при некоторых условиях (например, если нет необходимости в иммортализации клеток *de novo* или если зараженные клетки растут при высокой концентрации сыворотки) для этого процесса не требуется никакого фрагмента большого Т-антигена; этот факт, возможно, отражает роль среднего Т-антигена в этом явлении. Так как белки, которые требуются для поддержания трансформации вирусом РУ, а в некоторых условиях и SV40 (средний Т-антиген и, возможно, малый Т-антиген вируса РУ и малый Т-антиген SV40), в значительной степени несут существенны для литической инфекции в некоторых линиях культуральных клеток, возникает вопрос, справедливо ли это *in vivo*, если иметь в виду, что данные вирусы неопухолеродны для мышей и обезьян. Нельзя исключить, что, как уже предполагалось выше, средний и малый Т-антигены вируса РУ и малый Т-антиген SV40 необходимы этим вирусам для репликации и(или) персистенции в их природных хозяевах.

Биологические функции и биохимические свойства большого Т-антигена SV40 изучены довольно подробно. Сводка полученных данных представлена в табл. 26.1. Следует отметить, что

Таблица 26.1. Функции большого Т-антигена SV40 *in vivo* и *in vitro*

---

Связывание с ДНК (специфичное к участку начала репликации)
Связывание с ДНК (с любыми участками)
Сопутствующие ферментативные активности
АТРазная
киназная (функция самого Т-антигена?)
аденилирование Т-антигена (функция самого Т-антигена?)
Связывание с р53
Активация поздней транскрипции SV40
Ингибирование ранней транскрипции SV40
Индукция синтеза хозяйской ДНК в клетках, покоящихся в G-фазе
Действие в качестве составной части трансплантационного опухолеспецифичного антигена SV40
Инициация репликации вирусной ДНК
Установление и поддержание трансформации, вызываемой SV40
Стимуляция роста аденовирусов человека в клетках обезьян

---

большой Т-антиген необходим для каждого нового цикла синтеза вирусной ДНК и играет специфическую роль в процессе инициации [21, 166]. Он подавляет транскрипцию ранней области и усиливает как непосредственно, так и косвенным образом экспрессию поздней области [15, 31, 46, 90, 91, 119, 129, 169]. Боль-

шой Т-антиген является ДНК-связывающим белком, имеющим особенно высокое сродство к нескольким сайтам на участке начала репликации и вблизи его. Способность этого белка к инициации репликации определяется, по крайней мере частично, его связыванием с одним из этих сайтов, а к регуляции транскрипции — по меньшей мере с двумя другими [48, 73, 102, 130, 154]. Большой Т-антиген стимулирует также переход в S-фазу клеток, покоящихся на стадии G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> [40, 78, 79, 175]. Являясь составной частью плазматической мембраны, он может служить опухолеспецифичным трансплантационным антигеном [3, 19, 127, 171, 177]. С биохимической точки зрения неясно, как работает этот белок в процессе трансформации; известно лишь, что для участия в этом процессе ему не требуется способность к инициации репликации [24, 25, 29, 49, 63, 85, 121, 133, 161].

Большие Т-антигены вирусов SV40 и РУ являются ДНК-независимыми АТРазами [56, 61, 69, 174]. Большой Т-антиген SV40 обладает также специфической протеинкиназной активностью, фосфорилирующей сериновые и треониновые остатки [13, 69, 174]. В настоящее время неизвестно, определяется ли киназная активность вирусом. Если наблюдаемая активность обусловлена связанным клеточным белком, то его размеры, по-видимому, невелики и он тесно связан с большим Т-антигеном [13]. Недавно полученные данные *in vitro* свидетельствуют о том, что большой Т-антиген обратимо аденилируется по сериновым остаткам посредством направляемой им самой реакции, во время которой при инкубации комплекса большой Т-антиген—АМР с пиродифосфатом в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup> освобождается связанный нуклеотид [14]. Потенциальное значение этой реакции неясно, имеются предположения о возможном отношении этой реакции к функции большого Т-антигена при инициации репликации вирусной ДНК (см. ниже).

Большой Т-антиген фосфорилирован по меньшей мере в 10 специфических местах — по 8 сериновым остаткам (номера 106, 111, 123, 124, 639, 676, 677, 679) и по 2 треониновым (номера 124, 701) [144]. Косвенные данные свидетельствуют о том, что фосфорилирование является медленным, регулируемым и упорядоченным процессом, причем присоединение по крайней мере одного фосфата происходит в цитоплазме к только что синтезированному белку [145]. Функциональное значение этой модификации неясно. Кроме того, получены данные, показывающие, что если разделить белок на две фракции — одну, содержащую большой Т-антиген, способный связываться с участком начала репликации, и другую, не связывающуюся с этим участком, то в первой фракции белок меньше фосфорилирован по сравнению со второй [145]. Пока нет строгих доказательств, что фосфорилирование необходимо для способности большого Т-ан-



тигена связываться с ДНК. Однако, поскольку имеется по меньшей мере 10 мест фосфорилирования и, вероятно, не все молекулы большого Т-антигена способны связываться с ДНК, связывание с ДНК *in vivo* и фосфорилирование могут оказаться взаимосвязанными процессами.

В зараженных клетках большой Т-антиген, по-видимому, присутствует в нескольких формах. Его можно выделить в виде мономера, в виде целой серии агрегированных олигомерных форм или же как часть стабильного нековалентного комплекса с клеточным фосфопротеином р53 [95, 99, 108]. После синтеза мономера происходит медленное образование олигомеров. Имеются данные, показывающие, что для олигомеризации большой Т-антиген должен быть функционально интактным [45, 67, 110, 125]. Более того, оказывается, что р53 связывается с большим Т-антигеном, лишь когда последний олигомеризован до агрегатов определенного размера [67]. Связывание р53 с большим Т-антигеном *in vitro* не влияет заметно ни на связывание последнего с ДНК, ни на его АТФазную активность [23]. Комплексы большого Т-антигена с р53 регулярно обнаруживают как в зараженных SV40 пермиссивных клетках, так и в трансформированных непермиссивных клетках, причем в последнем случае комплекс более стабильный [33]. В экстрактах трансформированных клеток сродство р53 к большому Т-антигену оказывается очень высоким и большой Т-антиген защищает р53 от относительно быстрой деградации внутри клетки [100]. Далее известно, что р53 локализован в ядрах как незараженных клеток, так и клеток, содержащих большой Т-антиген. Сопоставляя эти данные, можно предполагать, что такой комплекс физиологически важен, хотя пока его роль неясна.

В настоящее время существенно меньше известно о функциональных свойствах малого Т-антигена SV40, как *in vivo*, так и *in vitro*. В покоящейся культуре некоторых постоянных клеточных линий стабильная трансформация требует наличия и большого, и малого Т-антигенов SV40 [104]. Роль малого Т-антигена, по-видимому, частично состоит в том, чтобы переводить клетки, покоящиеся на стадии G<sub>1</sub>, в растущие [149]. Кроме того, имеются данные, показывающие, что для поддержания трансформации необходимо присутствие в клетке обоих белков [11, 49; 51, 79, 104, 133, 153, 156]. Следовательно, эти два белка имеют комплементарные функции в трансформации. Но большой Т-антиген может в некоторых случаях участвовать в трансформации (как *in vivo*, так и *in vitro*) и без малого Т-антигена [51, 98].

При рассмотрении всех имеющихся данных (на уровне механизма) необходимость малого Т-антигена для трансформации кажется недостаточно обоснованной. Однако можно предпола-

гать, что если клетка образует большое количество активного большого Т-антигена, то необходимость в малом Т-антигене отпадает [49, 94, 133]; возможно, это обусловлено тем, что при некоторых условиях оба белка могут прямым или косвенным образом осуществлять одну и ту же функцию, играющую критическую роль в трансформации. Другая возможность заключается в том, что малый Т-антиген не требуется для стабильной трансформации тех клеток, в которых имеются клеточные функции, способные заменить малый Т-антиген в процессе трансформации.

Малый Т-антиген SV40 синтезирован в *Escherichia coli*, причем очищенный бактериальный продукт выделен в больших количествах [9]. Как и предполагалось ранее на основании опытов по микроинъекции ДНК *in vivo* [66, 133], очищенный белок вызывает распад нитевидных структур актина в нетрансформированных клетках крысы. Неясно, каким действием малого Т-антигена это обусловлено: физиологическим или фармакологическим; неизвестно также, каким образом белок вызывает подобное изменение цитоскелета. Большой и малый Т-антигены SV40 имеют на N-конце одинаковую последовательность длиной 82 аминокислотных остатка (рис. 26.1); остальная часть молекулы каждого из этих белков имеет большие размеры и состоит из уникальных аминокислотных последовательностей. Кроме того, хотя часть молекул обоих белков находится в ядре, малый Т-антиген, по-видимому, не связывается с ДНК, он не фосфорилирован и в отличие от большого Т-антигена представлен в значительном количестве и в цитоплазме. Малый Т-антиген имеет тенденцию просачиваться из ядер в условиях гипотонического шока, что не характерно для большого Т-антигена. Кроме того, в отличие от большого у малого Т-антигена иммунофлуоресценция внутри клетки после гипотонического шока в значительной степени уменьшается и затем после возвращения к изотоническим условиям быстро восстанавливается [42]. Эффект уменьшения флуоресценции объясняется не деградацией белка или его выходом в культуральную среду, а скорее тем, что находящийся внутри клетки малый Т-антиген «прячется» от антитела [92]. На основании этих данных можно предположить, что малый и большой Т-антигены, вероятно, по-разному «закреплены» в одной и той же клетке, возможно, даже в одном и том же ее компартменте (т. е. ядре). Чтобы проверить это предположение, Мерфи и др. [113] использовали колонку с содержащей малый Т-антиген SV40 сефарозой. При пропускании через нее смеси клеточных белков они обнаружили, что три из них с мол. массами 57, 32 и 20К избирательно связываются с малым Т-антигеном и не связываются в этих условиях с множеством других адсорбентов, взятых в качестве контроля. Белки 57 и 32К обна-



руживаются исключительно в растворимой фракции незараженных клеток, в то время как белок 20К в опытах по биохимической экстракции оказался прочно связанным с ядром [42]. Показано, что белок 57К представляет собой тубулин. Два других белка не идентифицированы; более того, неясно, образуют ли все эти белки комплекс с малым Т-антигеном *in vivo*. Ранделл с сотрудниками идентифицировали два белка: 57 и 32К, которые иммунопреципитируются некоторыми сыворотками животных с опухолями совместно с малыми Т-антигенами вирусов SV40, РУ и ВК [135—137]. Сравнительный анализ размеров белков показывает, что эти два белка могут отличаться от белков из полос 57 и 32 К, о которых говорилось выше. Эти результаты свидетельствуют о том, что малый Т-антиген может образовывать комплекс с несколькими определенными полипептидами, но они не дают ответа на вопрос, существуют ли такие комплексы *in vivo*.

Средний Т-антиген вируса РУ уникален среди ранних белков паповириусов в том смысле, что у SV40 и вируса ВК, по-видимому, нет аналогичных ранних белков. Он имеет мол. массу 57 К и представляет собой связанный с мембраной фосфопротеин [80, 143]. Со средним Т-антигеном связана тирозинспецифичная киназная активность *in vitro*, поскольку в иммунопреципитате он оказывается меченым по меньшей мере по одному определенному тирозиновому остатку [41, 142, 143]. Генетические данные указывают на тесную корреляцию между киназной активностью и способностью к трансформации, что свидетельствует о ее необходимости в данном процессе. Имеются также данные, показывающие, что этой ферментативной активности недостаточно для трансформирующей функции белка. Недавно Куртнейдж и Смит обнаружили, что средний Т-антиген может быть выделен в комплексе с  $pp60^{c-src}$ , известной тирозинкиназой [30] и клеточным аналогом трансформирующего белка ( $pp60^{v-src}$ ) вируса саркомы Рауса. В настоящее время полагают, что этот белок служит источником киназной активности, связанной со средним Т-антигеном.

Средний Т-антиген содержит на С-конце последовательность из 22 коллинеарных, незаряженных гидрофобных аминокислот, с обеих сторон соединенных с кластерами основных остатков. Структура этого участка похожа на структуру других участков, которые включаются в плазматическую мембрану. Кармайклу с соавторами генетическим путем удалось получить мутант, в котором эта последовательность отсутствовала (мутант был назван 1387Т) [18]. Клетки, зараженные таким мутантным вирусом, не трансформируются, а укороченные молекулы среднего Т-антигена не обладают киназной активностью и не способны связываться с мембранными структурами. Эти данные указы-

вают на важную роль гидрофобного хвоста в процессе включения в мембрану и выдвигают интересную гипотезу о том, что средний Т-антиген включается в мембрану в качестве субстрата специфической тирозинкиназы и (или) в комплексе с этим ферментом, т. е. с pp60<sup>c-src</sup>.

Как уже упоминалось выше, есть также данные, показывающие роль среднего Т- и (или) малого Т-антигенов в литическом цикле вируса РУ. Несколько лет тому назад Бенджамин описал класс мутантов РУ (мутанты по спектру хозяев), которые не способны к интенсивному росту в линиях мышинных клеток, обычно используемых для выращивания вирусов, однако могут расти в мышинных клетках, трансформированных вирусом РУ [6]. Для интенсивного роста этих мутантных вирусов требуются либо клетки почек мышат, либо некоторые мышинные линии, трансформированные вирусом РУ, либо клетки, химически трансформированные или зараженные ретровирусом мышей [64]. Мутанты этого класса также не могут интенсивно размножаться в здоровых мышах и абсолютно не способны к трансформации как *in vivo*, так и *in vitro* [6, 159]. При всех подобных мутациях изменяются структуры как среднего, так и малого Т-антигенов. Биохимический дефект в литическом цикле имеет место на поздней стадии — при заражении синтезируется нормальное количество вирусной ДНК и капсидных белков, однако выход вируса оказывается низким. По-видимому, дефект заключается в нарушении процесса сборки инфекционных частиц. Дефект по трансформации, очевидно, связан с функцией среднего Т-антигена. Причина литического дефекта окончательно не установлена, однако в работе Гарсеа и Бенджамина [55] показано, что малый Т-антиген в нетрансформирующих мутантах по спектру хозяев не фосфорилирует нужным образом мажорный капсидный белок VP1. Неизвестно, является ли это основной причиной, мешающей образованию инфекционного вируса, однако можно предполагать, что это так.

Получены аналогичные мутанты SV40, т. е. вирусы, дефектные по образованию новых инфекционных вирионов, однако обладающие почти нормальными ранними функциями, включая синтез вирусной ДНК. Описаны два таких мутанта — один с температурочувствительным фенотипом и другой, нежизнеспособный делеционный мутант [29, 165]. Мутации в этом и другом мутанте затрагивают большой Т-антиген SV40, но влияют на разные его функции [26, 29, 165]. Таким образом, большой Т-антиген SV40 активен и в поздней фазе литического цикла. В связи с этим было бы интересно выяснить, как его поздние функции соотносятся с поздними функциями продуктов генов малого Т-антигена у мутантов по спектру хозяев вируса РУ и оказывают ли влияние хотя бы некоторые из этих поздних функ-

ций на развитие трансформированного фенотипа у непермиссивных клеток.

### **Транскрипционные единицы вируса РУ и SV40**

Как отмечалось выше, геномы обоих вирусов устроены сходным образом в отношении локализации двух транскрипционных единиц и тех регуляторных последовательностей, которые управляют экспрессией (рис. 26.1). К последним относятся находящиеся на участке начала репликации ранние и поздние промоторы, расположенные выше по последовательности потенциальные регуляторные участки, а также энхансерные элементы. Кроме того, в этой области располагаются участки специфического связывания большого Т-антигена, которые оказывают влияние на регуляцию транскрипции геномов. В данной главе основное внимание уделяется тому, что известно об этих последовательностях, необходимых для правильной регуляции экспрессии вирусных генов.

### **Регуляция транскрипции вируса РУ**

На рис. 26.1 представлена карта ранних и поздних транскриптов вируса РУ, на которой локализованы их 5'-концы, донорные и акцепторные последовательности сплайсинга и 3'-концы. Более подробная схема участка начала репликации дана на рис. 26.2. После минимального участка начала репликации (если двигаться в сторону ранних генов) находится ТАТА-последовательность Гольдберга—Хогнесса, которая детерминирует мажорную точку старта транскрипции около 150-го нуклеотида. Интересно отметить, что наличие этой последовательности не обязательно для жизнеспособности вируса и, следовательно, для ранней транскрипции, поскольку ее можно deletировать без заметного ущерба для синтеза ранних белков [87]. В этом случае начинают работать гетерогенные минорные точки старта транскрипции, заметные и при заражении вирусом дикого типа, т. е. инициация транскрипции регулируется участками, отличными от упомянутой выше ТАТА-последовательности.

За 54 bp до последовательности ТАТА расположена последовательность ССАТ. Пока неизвестно, является ли она, как в случае β-глобина и тимидинкиназы HSV-1 [71, 109], регуляторным участком для транскрипции. Наконец, внутри участка, который содержит специфические сайты, обладающие в выделенных ядрах повышенной чувствительностью к ДНКазе I [77], находится последовательность, которая служит энхансером для

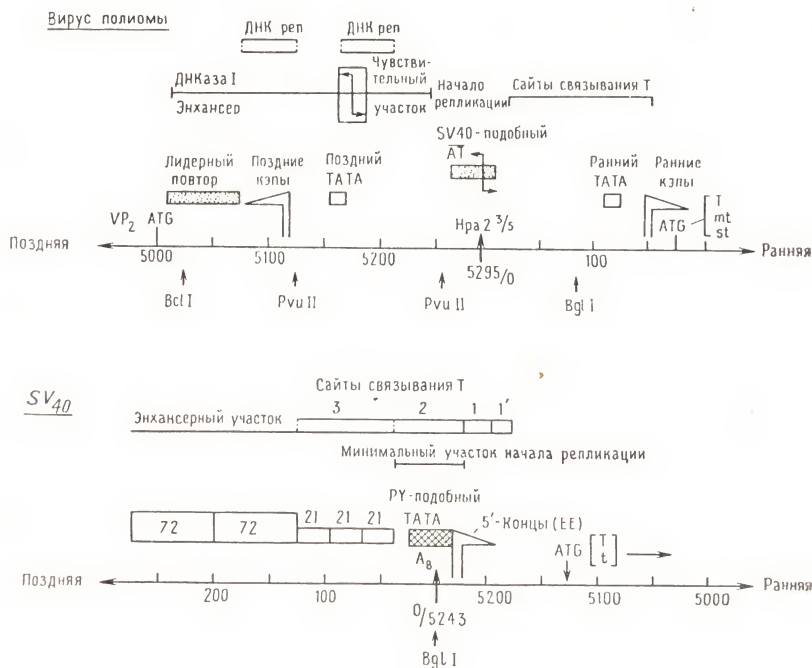


Рис. 26.2. Участки начала репликации и регуляторные участки транскрипции вируса РУ и SV40. Обозначения:  $\boxed{\phantom{x}}$  — инвертированный повтор,  $\overline{AT}$  — уча-

стки, обогащенные парами AT;  $\triangle$  — локализация 5'-концов мРНК; короткие вертикальные штриховые линии — приблизительное положение границ соответствующих участков. Локализация двух последовательностей в энхансерной области, способствующих репликации ДНК (ДНК реп), взята из [112].

ранней транскрипции [4, 37, 52, 72, 73, 101, 111, 178]. Последовательности по обеим сторонам от сайта *Pvu II* (этот сайт имеет координату 67,4 ед. карты) составляют две части энхансерной структуры, которые могут действовать независимо друг от друга. Каждая из них может усиливать экспрессию чужеродного гена в любой ориентации, выше или ниже соответствующего промотора. Имеются также данные, показывающие, что при экспрессии гена хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT), регулируемого промотором гена коллагена цыплят, последовательность, лежащая со стороны поздней области от вышеупомянутого сайта *Pvu II*, является более сильным энхансером по сравнению с энхансерными элементами, находящимися между двумя



сайтами *Pvu* II (координаты 67,4 и 70 ед. карты) [12]. В настоящее время неизвестно, справедливо ли это и для других промоторов и связанных с ними генов.

Вид и строение энхансерного участка, по-видимому, важны для выяснения, будет ли экспрессироваться ранняя область в дифференцированных клетках с различными фенотипами. Так, например, вирус РУ дикого типа не способен реплицироваться в ряде линий тератокарциномы мышей [54, 88, 89, 123, 151, 155, 163, 179]. В данном примере это объясняется нарушением экспрессии ранних генов, по-видимому, на стадии транскрипции. В последние годы в нескольких лабораториях выделены мутанты РУ, которые могут реплицироваться в этих клетках. Оказалось, что мутации в их геноме сгруппированы на участке, обладающем повышенной чувствительностью к ДНКазе I, о котором упоминалось выше. Было изучено два типа таких мутантов. Оказалось, что в тех мутантах, которые способны расти в клетках линии РСС4, произошла дупликация последовательности, находящейся на «поздней» стороне обогащенной парами GC большой палиндромной последовательности внутри упомянутого выше участка (5175-й нуклеотид) [88]. Вставка этой дублированной последовательности произошла в месте делеции с «ранней» стороны вышеупомянутого палиндрома. В противоположность этому для тех мутантов по спектру хозяев, которые могут расти на другой линии тератокарциномы, F-9, наиболее общей чертой является наличие точечной мутации вблизи того же обогащенного парами GC инвертированного повтора [54, 89]. Одна из гипотез, объясняющих этот факт, заключается в предположении, что мутации обоих типов приводят к модификациям энхансера, позволяющим работать в недифференцированных клетках тератокарциномы. Возможно, что подобные мутации приводят к возникновению эмбрионального тканеспецифичного энхансерного элемента транскрипции. Заслуживает внимания тот факт, что GC-богатый инвертированный повтор относительно устойчив к действию ДНКазы и находится в окружении гиперчувствительных участков. В связи с этим можно выдвинуть предположение о том, что *in vivo* с подобной структурой связываются один или несколько специфических белков и что это связывание играет важную роль в механизме действия энхансера. Другая возможность заключается в том, что инвертированный повтор, расположенный на участке, важном также для репликации вирусной ДНК, может быть местом связывания одного или нескольких клеточных белков, участвующих в этом процессе [112, 178]. Анализ с помощью ЭВМ вторичной структуры участка, включающего обогащенный GC-парами инвертированный повтор, показал, что на этом участке возможно образование многочисленных шпильчатых структур [89, 179]. Важно

отметить, что в наиболее стабильной гипотетической структуре ( $\Delta C = -34$  ккал) в мутантах F-9 внутри теоретически стабильной шпильки были обнаружены две вставки А/Т. Биологические данные свидетельствуют о том, что мутация с делецией—дупликацией, вероятно, необходима для роста в клетках РСС4 и что она для этого достаточна, если GC-обогащенный палиндром остается интактным. Однако, поскольку РСС4-мутанты не могут расти в клетках F-9, нельзя утверждать, что неизменный палиндром в сочетании с дупликацией обеспечивает экспрессию раннего участка в этих условиях. Вместе с тем небольшая вставка в наиболее стабильном участке шпильки структуры типа «клеверного листа» обеспечивает рост в клетках F-9, причем образующиеся мутанты способны расти в клетках РСС4. Эти данные указывают на то, что протяженный палиндром имеет ключевое значение в экспрессии раннего участка в недифференцированных клетках по крайней мере двух типов и позволяют сделать предположение, что делеция—дупликация в мутантах РСС4 косвенным образом влияет на регуляторную (возможно, энхансерную) функцию этой палиндромной последовательности в процессе транскрипции.

Промотором поздней транскрипции является структура, содержащая ТАТА-последовательность, расположенная на расстоянии  $\sim 100$  нуклеотидов от места начала репликации в «позднюю» сторону и за  $\sim 30$  нуклеотидов до кластера основных кэп-сайтов, сгруппированных около 5120-го нуклеотида. Сразу за местом инициации поздней транскрипции расположена последовательность длиной  $\sim 60$  нуклеотидов, которая многократно повторяется на нетранслирующемся участке 5'-конца большей части поздних вирусных мРНК [97]. После начала поздней транскрипции ядра клеток, зараженных вирусом РУ, содержат много очень длинных олигомерных поздних мРНК, которые представляют собой продукт непрерывной транскрипции поздней цепи [1]. Частью посттранскрипционного процессинга таких гигантских первичных транскриптов является образование в результате сплайсинга несовершенной тандемной структуры из множественных копий лидерного повтора. В результате сплайсинга и полиаденилирования образуются готовые для трансляции зрелые цитоплазматические мРНК. При литической инфекции SV40 подобные олигомерные формы поздней ядерной вирусной РНК составляют минорную фракцию или вообще не образуются.

Как и в случае SV40, ранняя транскрипция вируса РУ подвержена негативному транс-воздействию большого Т-антигена. Механизм, с помощью которого это происходит, в настоящее время мало изучен. Однако основную роль в этом процессе, по-видимому, играет связывание со специфическими сайтами неда-

леко от точки начала репликации, впервые обнаруженное Годреем с соавторами [57] и позднее более подробно изученное несколькими группами [38, 122]. Дилворт с соавторами [38] недавно обнаружили три участка связывания большого Т-антигена с приблизительно одинаковым сродством, которые расположены в виде тандемного повтора на отрезке между 30-м нуклеотидом и сайтами ранних кэпов (рис. 26.2). Оказалось, что каждый из этих участков длиной 35—40 нуклеотидов содержит олигонуклеотид GAGGC, который, по крайней мере частично, отвечает за связывание большого Т-антигена SV40 с двумя сайтами специфического связывания в области начала репликации [35, 83, 170, 173]. Возможно, что этот олигонуклеотид и определяет специфичность взаимодействия между большим Т-антигеном вируса РУ и сайтами связывания [38, 57, 122]. Мало что известно о том, каким образом большой Т-антиген вируса РУ подавляет раннюю транскрипцию [32, 81]. Однако, поскольку в настоящее время имеется возможность проводить раннюю транскрипцию вируса РУ *in vitro* [32, 81] и биохимически выделять активный большой Т-антиген вируса РУ [38], вскоре, по-видимому, должны появиться данные о роли связывания большого Т-антигена с участком начала репликации при подавлении ранней транскрипции. Как мы увидим позднее, топография участка начала репликации генома вируса РУ (рис. 26.2) в некотором смысле обратна взаимному расположению самого сильного из всех известных сайтов связывания большого Т-антигена и ранних кэпов у SV40. При этом связывание большого Т-антигена SV40 с самым сильным сайтом подавляет раннюю транскрипцию *in vivo* [73, 130, 131]. Таким образом, у разных вирусов механизмы репрессии ранней транскрипции могут существенно различаться.

Когда начинается репликация ДНК, в клетках, зараженных SV40 или вирусом РУ, появляются первые новосинтезированные зрелые поздние вирусные мРНК. Вскоре после этого скорость поздней транскрипции возрастает и соотношение скоростей поздней и ранней транскрипции становится равным 20:1. Частично это обусловлено избирательным подавлением ранней транскрипции большим Т-антигеном и, кроме того, увеличением числа основных матриц для поздней транскрипции, т. е. новосинтезированных сверхспиральных вирусных ДНК. Более того, для системы SV40 есть данные, свидетельствующие о том, что большой Т-антиген необходим не только для запуска репликации, но и для активации поздней транскрипции [15, 90]; для вируса РУ этого пока не показано. Мы подробнее остановимся на данном вопросе в следующем разделе.



## Регуляция транскрипции SV40

Область начала репликации SV40 содержит также основные элементы регуляции ранней и поздней транскрипции. О регуляторных нуклеотидных последовательностях ранней транскрипции SV40 известно гораздо больше, чем о регуляторных последовательностях поздней транскрипции, поэтому здесь мы уделим больше внимания анализу первых.

В обезьяньих клетках вскоре после заражения SV40 обнаруживаются ранние вирус-специфические мРНК. Промотор, с которого начинается их синтез, содержит структуру Гольдберга—Хогнесса, лежащую на расстоянии 30 нуклеотидов выше 5'-концов этих мРНК [7, 58, 59, 74, 130, 131]. Как и в случае раннего промотора вируса РУ, делетирование последовательности ТАТА не ведет к заметному ослаблению транскрипции ранней области *in vivo* [7, 59]. Однако так же, как и у делеционных мутантов РУ, это приводит к появлению гетерогенного набора 5'-концов ранних мРНК. Эффект ТАТА-последовательности, состоящий в устранении множественности точек инициации, был показан также в экспериментах с мутантами, имеющими небольшие делеции ниже последовательности ТАТА [7, 59]. Результаты этих экспериментов показали, что независимо от размера исследуемой делеции расстояние между ТАТА и 5'-концами ранних РНК составляет  $\sim 30$  бр.

Обнаружен действующий регуляторный элемент ранней транскрипции, расположенный выше по последовательности [44, 52, 75]. Он находится внутри участка длиной  $\sim 60$  нуклеотидов, который со стороны поздней области примыкает к минимальному участку начала репликации (рис. 26.2). Этот элемент состоит из трех tandemных повторов длиной 21 бр, каждый из которых содержит две tandemно ориентированные канонические последовательности  $G_{3-4}CG_2Pu_2$ . Сейчас получены новые данные, свидетельствующие о том, что этот участок играет важную роль в регуляции ранней транскрипции *in vivo* и, возможно, оказывает также большое позитивное воздействие и на позднюю транскрипцию [52, 75].

Со стороны поздней области к 21-парным повторам примыкают два tandemно ориентированных повтора длиной 72 бр, которые составляют энхансерный участок для ранней транскрипции SV40 [4, 53, 72, 111]. Они могут действовать, находясь в любой ориентации выше по цепи, ниже или внутри кодирующей последовательности ранней области. Для энхансерного эффекта *in vivo* требуется только одна копия 72-парного повтора [72], причем было показано, что этот энхансер способствует также экспрессии *in vivo* целого ряда клонированных клеточных генов. Обнаружено также, что в клетках обезьяны или человека он



более эффективен, чем в клетках грызунов. Это согласуется с предположением о том, что с ним взаимодействуют видоспецифические клеточные белки и благодаря этому взаимодействию достигается оптимальный энхансерный эффект *in vivo*. Так же как и в случае энхансерного участка вируса РУ, 72-парные повторы находятся внутри участка с повышенной чувствительностью к ДНКазе I; это было показано при помощи методов, аналогичных тем, которые применялись при изучении клеток, зараженных вирусом РУ [77, 147, 162]. Более того, при изучении этих последовательностей обнаружено, что для tandemных генов энхансерный эффект наблюдается сильнее всего в отношении тех генов, которые находятся ближе к промотору [84, 180]. Одно из объяснений эффекта «закрытия» промоторов заключается в том, что энхансерный элемент (т. е. 72-парный повтор) служит в качестве точки «вхождения» РНК-полимеразы II, которая затем мигрирует вдоль цепи ДНК, пока не находит первый «подходящий» промотор. Возможно и другое объяснение — не исключено, что энхансерный элемент является последовательностью, с которой связывается некоторый специфический клеточный белок (или белки), вследствие чего образуется белковый комплекс с участием соседнего промотора, с которым в свою очередь связываются один или несколько полипептидов, осуществляющих транскрипцию. Главным следствием образования такого комплекса может быть инициация транскрипции в соответствующем промоторе.

В настоящее время известно множество энхансерных элементов вирусных и клеточных генов. Сравнивая последовательности энхансерных элементов того минимального размера, при котором они еще остаются активными, Хаури и Грус [92] предложили последовательность, являющуюся кандидатом на консенсус:

AAA  
GTGGTTTG

Эта последовательность имеется и в активном участке 72-парного повтора SV40.

После того как начинается репликация вирусной ДНК, активируется второй ранний промотор, причем 5'-концы ранних мРНК сдвигаются вверх на 40 нуклеотидов [58, 73]. Для такого сдвига требуется большой Т-антиген, причем сдвиг происходит не за счет связывания большого Т-антигена с самым «сильным» сайтом — последовательностью из 30 нуклеотидов, примыкающей со стороны ранней области к минимальному участку начала репликации (сайт 1) [73]. В жизнеспособных мутантах, имеющих делецию в сайте 1, благодаря которой нарушается

связывание, при активации репликации ДНК также наблюдается сдвиг раннего промотора [73]. Разумное объяснение данного эффекта заключается в том, что этот сдвиг вызывается, по крайней мере частично, процессом инициации репликации, в котором основную роль играет большой Т-антиген. Точный состав последовательностей, которые составляют верхний промотор, в настоящее время не выяснен. По-видимому, важную роль здесь играют последовательности, лежащие внутри участка, содержащего 21-парный повтор [44, 52, 75]. Внутри фрагмента этого участка, содержащего повторы длиной 8—9 bp, имеются небольшие А/Т-последовательности «спейсерного» типа, и было бы интересно выяснить, определяют ли они, куда именно сдвигаются точки старта ранней транскрипции.

Как отмечалось выше, активация поздней транскрипционной единицы SV40 частично определяется действием большого Т-антигена. Важно отметить, что действие этого белка приводит к амплификации активных матриц для поздней транскрипции (новосинтезированных сверхспиральных вирусных ДНК), так как он иницирует синтез вирусных ДНК. Кроме того, генетические эксперименты, выполненные несколько лет назад в группе Тетмейера [31], показали, что большой Т-антиген играет роль «переключателя» ранней и поздней транскрипции. Они обнаружили, в частности, что некоторые температурочувствительные мутанты по цистрону большого Т-антигена не способны «запустить» позднюю транскрипцию, если в ходе эксперимента заражение происходит при непермиссивной температуре. Однако если температуру меняют до непермиссивной после того, как начались синтез вирусной ДНК и интенсивная поздняя транскрипция, то поздняя транскрипция продолжается несмотря на то, что синтез новых вирусных ДНК полностью останавливается. Последующие работы, выполненные в лабораториях Хаури и Старка, показали, что поздняя транскрипция с некоторой эффективностью происходит и на ранней стадии, однако при этом не синтезируется функционально активная поздняя мРНК [46, 119]. Келлер и Олвин [90] и Брэди с соавторами [15] обнаружили, что большой Т-антиген активирует позднюю транскрипцию и в отсутствие репликации вирусной ДНК. В дополнение к этому было показано, что мутация, благодаря которой нарушается связывание большого Т-антигена с участком начала репликации, подавляет этот эффект [90]. Следовательно, способность большого Т-антигена специфически связываться с участком начала репликации, по-видимому, играет важную роль в этом явлении. Изучению этой способности должны помочь опыты, которые проводятся с геномами, имеющими селективные мутации в индивидуальных сайтах связывания большого Т-антигена. Имеющиеся данные, взятые в совокупности, свидетельствуют о том,

что есть по меньшей мере два различных процесса, осуществляющих регуляцию поздней транскрипции, — прямая активация большим Т-антигеном транскрипционной единицы и вызываемая большим Т-антигеном амплификация поздних матриц в результате репликации вирусной ДНК.

Структура позднего промотора SV40 изучена не так детально, как структура раннего промотора, однако имеющиеся данные показывают, что она отличается сложностью и многокомпонентностью. В отличие от поздней транскрипции вируса РУ и от ранней транскрипции SV40 и вируса РУ инициация поздней транскрипции SV40 происходит в большом числе стартовых точек, распределенных в сегменте длиной 300 bp [60] (рис. 26.1 и 26.2). Практически же большая часть точек старта, находящихся вблизи промотора, расположена на участке, содержащем 72-парный повтор. Кроме того, результаты исследований, выполненных в двух лабораториях, свидетельствуют о важном значении для поздней транскрипции 21-парных повторов [52, 147]. Получены также данные о том, что важным элементом является минимальный участок начала репликации даже в тех клетках, которые не могут поддерживать репликацию вирусного генома [28]. Принимая во внимание скорость, с какой появляются работы, посвященные изучению делеций, замен и вставок на участке начала репликации, уже в ближайшем будущем можно ожидать более полного описания всех элементов ДНК, участвующих в регуляции поздней транскрипции.

Как уже отмечалось выше, большой Т-антиген подавляет раннюю транскрипцию SV40. Это происходит, по крайней мере частично, за счет его связывания с двумя последовательностями, расположенными в области начала репликации. Согласно одной из моделей, учитывающих влияние такого связывания на механизм ингибирования транскрипции, связывание с самым «сильным» сайтом (сайт 1, см. рис. 26.2), который примыкает с «ранней» стороны к участку начала репликации, приводит к подавлению транскрипции с нижнего раннего промотора и лишь к частичному подавлению тех точек инициации полимеразы II, которые контролируются верхним промотором [73]. Можно считать, что к полному подавлению транскрипции с обоих промоторов приводит связывание с обоими сайтами 1 и 2. В этом случае связывание с сайтом 2, по-видимому, приводит к тому, что большой Т-антиген приходит в соприкосновение с комплексом полимеразы II, находящимся на верхнем промоторе. Эти выводы сделаны на основании данных, полученных как *in vivo*, так и *in vitro* [73, 130].

Как отмечалось выше, при сравнении общей структуры областей начала репликации SV40 и вируса РУ возникают спорные вопросы. Между этими областями имеется бросающееся в глаза



сходство: а) в обоих случаях основу структуры областей начала репликации составляют, в частности, протяженные инвертированные повторы; б) на границе с поздней областью минимальный участок начала репликации содержит последовательность, обогащенную парами АТ; и в) в этих областях содержится ранний 5'-энхансер. Однако в отличие от SV40 главный ранний промотор вируса РУ не перекрывается с основными структурами области начала репликации и ранняя ТАТА-последовательность находится ниже известных в настоящее время сайтов связывания большого Т-антигена. Геном SV40 имеет такое строение, что на основании данных о системах регуляции прокариот легко можно представить, как большой Т-антиген блокирует начало работы РНК-полимеразы на соседнем промоторном участке. В случае вируса РУ заметная разобщенность участков связывания большого Т-антигена и начала ранней транскрипции дает основание предполагать, что, по-видимому, здесь имеется отличие от механизма SV40, согласно которому эффект подавления ранней транскрипции коррелирует со связыванием большого Т-антигена с областью начала репликации. Кроме того, у некоторых штаммов вируса РУ дикого типа нет тандемных повторов энхансерных структур. Однако при дальнейшем анализе некоторых мутантных штаммов была обнаружена дупликация последовательностей внутри энхансерного участка [134]. Можно предположить, что это имеет такое же функциональное значение, как и дупликация 72-парной энхансерной структуры в случае SV40. Участок начала репликации SV40 имеет важные регуляторные последовательности с тандемными повторами, оказывающие влияние на раннюю транскрипцию; в случае вируса РУ точных аналогов таких последовательностей нет. Можно предположить, что последовательность ССААТ, расположенная на ~50 нуклеотидов выше ТАТА-последовательности, оказывает в случае вируса РУ аналогичное действие на раннюю транскрипционную единицу, хотя в настоящее время нет данных, подтверждающих эту точку зрения. Таким образом, хотя оба вируса, по-видимому, эволюционировали от общего предшественника, очевидно, что формирование последовательностей, регулирующих экспрессию их генов, а следовательно, и определяющих, по крайней мере частично, их выживание в природных хозяевах, может быть следствием специфического давления отбора, вызываемого различными видами хозяев и (или) типами клеток, в которых они размножались и (или) персистировали в течение миллионов лет эволюции.

### Механизм репликации ДНК SV40

В целом механизмы регуляции автономной репликации ДНК в случае SV40 и вируса РУ в пермиссивных клетках чрезвычай-



но сходны. Поскольку относительно механизма репликации ДНК SV40 опубликовано значительно больше данных, ему и будет уделено основное внимание.

### Участок начала репликации

Последовательность длиной  $\sim 60$  бр (пары оснований от 5215 до 30), по-видимому, служит минимальным участком начала репликации (рис. 26.2). В область начала репликации входят также участки инициации ранней транскрипции, инвертированный повтор длиной 27 бр, лежащий выше этих участков, и упоминавшийся ранее АТ-богатый участок длиной 17 пар нуклеотидов, который прилегает с поздней стороны к палиндрому. Как уже отмечалось, на участке начала репликации локализованы сайты специфического связывания большого Т-антигена. В настоящее время в опытах по защите от нуклеаз и по связыванию с фрагментами ДНК идентифицировано по крайней мере 4 таких сайта [35, 73, 137, 160, 170, 173]. За одним исключением (сайт 1'), они обозначены в соответствии с уменьшением сродства. Сайт 1' является продолжением сайта 1 в «раннюю» сторону и содержит  $\sim 15$  бр, а сродство большого Т-антигена к этому сайту приблизительно такое же, как к сайту 3 [170]; границы сайта 3 определены не так точно, как для сайтов 1, 2 и 1'. Однако имеющиеся в настоящее время данные дают основания предполагать, что в сайт 3 входят три копии 21-парного повтора, лежащие выше АТ-богатого 17-парного участка и граничащие с первым из двух 72-парных повторов [35, 152]. Кроме того, до сих пор четко не определена граница между сайтами 2 и 3; по-видимому, она находится поблизости от границы минимального участка начала репликации с «поздней» стороны. Итак, из сравнения результатов делеционного картирования и анализа нуклеотидной последовательности сайта связывания большого Т-антигена следует, что сайт 2 составляет значительную часть минимального участка начала репликации. Практически вся репликация вирусной ДНК начинается с этой последовательности, хотя Мартин и Сетлоу обнаружили минорный участок начала репликации на 3'-конце ранней области SV40, который во время пермиссивной инфекции [105] работает с низкой эффективностью.

После того как произошла инициация репликации, образуются две репликационные вилки, мигрирующие с приблизительно одинаковой скоростью в разные стороны. Каждая из вилок проходит  $\sim 50\%$  длины окружности кольцевой хромосомы от места начала репликации (0,17 ед. карты). Последовательности, на которых в норме заканчивается репликация, не являются строго обязательными для процесса терминации, поскольку

обычные вирусные последовательности на этом участке можно с успехом заменить широким набором клеточных последовательностей.

Получено много данных, показывающих, что прерывистый синтез цепи в каждойвилке происходит по механизму образования фрагментов Оказаки, согласно которому синтез каждого фрагмента иницируется короткой олигорибонуклеотидной заправкой [39]. Следовательно, на этой стадии процесса синтеза принимает участие ДНК-праймаза. И непрерывный синтез одной цепи, и прерывистый синтез другой, по-видимому, осуществляются ДНК-полимеразой  $\alpha$ , так, как оба этих процесса эффективно подавляются афидиколином — специфическим ингибитором этого фермента в клетках млекопитающих. Помимо того, что большой Т-антиген играет известную роль на стадии инициации, имеются данные, свидетельствующие о его участии в процессах, следующих после инициации [158]. Первые работы, посвященные изучению роли большого Т-антигена в репликации ДНК SV40, показали, что синтез вирусной ДНК в клетках, зараженных мутантом *tsA* (*ts*-мутация в цистроне большого Т-антигена), продолжается и при переносе их в непермиссивные условия, что приводит к появлению новосинтезированных интактных вирусных геномов. Однако в это время новые репликативные интермедиаты не образуются [22, 166]. Подобные результаты интерпретировали как свидетельство того, что большой Т-антиген участвует лишь в инициации синтеза вирусной ДНК, но не в последующих стадиях этого процесса. Однако недавно при изучении структуры репликативных интермедиатов Книпперс с соавторами обнаружили, что большой Т-антиген стабильно связывается со всеми фрагментами вирусного генома. Это, возможно, означает, что большой Т-антиген играет активную роль также и на стадиях синтеза ДНК, следующих за инициацией, когда он принимает такую форму, благодаря которой Т-антиген *ts A* становится устойчивым к изменениям температуры. Очевидно, чтобы это доказать, требуется дополнительная информация. Однако уже сейчас в пользу этой гипотезы свидетельствует обнаружение прочного связывания большого Т-антигена с различными фрагментами репликативного интермедиата.

Из генетических экспериментов [102, 154] известно, что для правильной инициации репликации большой Т-антиген должен связываться с сайтом 2. Выделен жизнеспособный холодочувствительный мутант, имеющий точечную мутацию в 27-парном инвертированном повторе внутри минимального участка начала репликации. Оказалось, что этот мутант условно дефектен по отношению к инициации репликации. Из данной популяции затем были выделены безусловные ревертанты. Удивительно, что среди них были обнаружены двойные мутанты, у которых вто-

рая мутация находится в цистроне большого Т-антигена [102, 154]. Таким образом, можно сделать заключение, что в процессе инициации репликации большой Т-антиген должен взаимодействовать с 27-парным инвертированным повтором.

Недавно Хэй и Депаμφилис получили дополнительную информацию относительно механизма инициации [76]. Они определили последовательности 5'-концов новосинтезированных дочерних цепей и сделали из своих результатов несколько выводов. Во-первых, процесс инициации, по-видимому, начинается в нескольких специфических сайтах Е-цепи. Основные сайты, в частности, локализованы в 27-парном повторе (который расположен рядом с сайтом 2 большого Т-антигена). Обнаружены также минорные сайты инициации в 21-парных повторах, которые, как описано выше, также являются частью сайта связывания большого Т-антигена и выполняют нужную, хотя и необязательную функцию в процессе инициации репликации [8]. Согласно результатам ранних электронно-микроскопических работ [105], непрерывный синтез дочерней Л-цепи начинается на участке, сдвинутом на  $\sim 30$  нуклеотидов в сторону ранней области от ближайшего сайта инициации Е-цепи. Синтез на матрице Л-цепи, по-видимому, иницируется в ряде сайтов при помощи механизма, который неотличим от прерывистого синтеза посредством фрагментов Оказаки. Прерывистый синтез на Е-цепи начинается предположительно в сайте, расположенном выше 21-парного повтора.

На 5'-концах всех непрерывных продуктов, синтезируемых на Е-цепи, по-видимому, находится АМР. Далее следуют 5—8 рибонуклеотидов, закодированных последовательностями, примыкающими к нуклеотиду на 5'-конце. За ними расположен участок, на котором начинается полимеризация дезоксирибонуклеотидов. Следовательно, зависящая от большого Т-антигена инициация синтеза ДНК — по-видимому, асимметричный процесс, в котором первые акты синтеза определяются последовательностями, содержащими описанные выше сайты связывания большого Т-антигена и чаще всего также минимальный участок начала репликации. В связи с этим частота случаев инициации в 21-парном повторе значительно ниже, чем в минимальном участке начала репликации, что согласуется с величиной сродства этих двух сайтов к очищенному большому Т-антигену.

Теоретически существует много объяснений соотношения между связыванием большого Т-антигена и наблюдаемой частотой инициации репликации. Принимая во внимание тот факт, что имеются олигорибонуклеотидные лидерные последовательности, примыкающие к 5'-концам дочерних Л-цепей, можно предположить, что хозяйскую праймазу в соответствующую точку на участке начала репликации направляет большой Т-антиген и



это позволяет ей начать синтез специфического олигорибонуклеотида. Есть и другая возможность — не исключено, что большой Т-антиген сам играет роль праймазы или затравки, возможно, путем образования ковалентного комплекса со специфическим рибонуклеотидом, например с АМР. Согласно еще одному предполагаемому механизму, концевые олигонуклеотиды могут быть продуктами малых РНК-инициаторов, синтез которых начинается существенно выше по последовательности. В этом случае концевые последовательности могут появляться в результате расщепления, осуществляемого большим Т-антигеном в специфических точках связывания.

Механизм терминации синтеза ДНК известен лишь частично. Во время разделения цепей на участке, где заканчивается репликация, есть небольшой незаполненный одноцепочечный пробел, который впоследствии заполняется, и в результате появляются новосинтезированные молекулы ДНК в форме I [20]. Интересно отметить паузу в функционировании репликационных вилок перед окончанием синтеза после того, как каждая из них прошла  $\sim 90\%$  соответствующей матрицы [164]. На основании этого наблюдения можно предположить, что процесс, ограничивающий скорость синтеза, определяет и стадию терминации. Возможно, что таким процессом является упомянутое выше заполнение одноцепочечного пробела, после которого следует разделение несвязанных дочерних молекул.

Не исключено также, что разделение новосинтезированных дочерних молекул происходит при помощи механизма, включающего образование димеров в форме катенанов [39]. Разделение таких структур могло бы катализироваться соответствующей топоизомеразой в процессе внутримолекулярной рекомбинации. Димеры-катенаны были обнаружены при литической инфекции, причем при помощи импульсной метки было показано, что ковалентно замкнутые димеры-катенаны появляются и исчезают [39]. Неизвестно, однако, связано ли исчезновение таких структур с появлением новых молекул в форме I, т. е. пока нет четких доказательств, что эти структуры являются репликационными интермедиатами.

## Интеграция геномов папавирусов

Геномы клеток, устойчиво трансформированных SV40 и вирусом РУ, содержат одну или несколько интегрированных копий по крайней мере части ранней вирусной области вместе с функционирующим ранним промотором. Большинство клеток, трансформированных SV40, содержат по крайней мере одну полную копию интактной ранней области и участка начала репликации, поэтому можно предполагать, что для процесса трансформации



необходим интактный или почти интактный большой Т-антиген. В противоположность этому в некоторых линиях клеток грызунов, трансформированных вирусом РУ, отсутствует до 40% ранней области [10]. Делетированный фрагмент обычно включает участки, расположенные ниже единственного в геноме сайта *Eco* RI. Мутант образует интактные малый и средний Т-антигены и укороченный большой Т-антиген. Имеющиеся в настоящее время многочисленные данные свидетельствуют о том, что для возникновения устойчиво трансформированного фенотипа у определенной линии клеток требуется большая часть молекулы среднего Т-антигена и лишь 60% молекулы большого Т-антигена с его N-конца. Роль малого Т-антигена в этом процессе в настоящее время неясна.

У некоторых SV40- и РУ-трансформантов отмечена интеграция более одного генома, причем во многих случаях интегрированные геномы представлены в виде тандемного повтора «голова-к-хвосту» [5, 10, 96, 138]. Одна из моделей, объясняющих относительно частое возникновение таких тандемных повторов, была предложена Чиа и Ригби [21]. Они обнаружили, что на поздней стадии непермиссивной инфекции геномы паповавирусов присутствуют в виде многокопийных неинтегрированных молекул. Им удалось показать, что олигомерные молекулы состоят из тандемных повторов «голова-к-хвосту». На основании этого было выдвинуто предположение, что такие молекулы возникли в результате репликации по механизму катящегося кольца [21]. Авторы предполагают, что в результате рекомбинации части таких тандемно повторяющихся геномов, по-видимому, в случайных местах хозяйской хромосомы и могли возникнуть интегрированные копии фрагментов этих структур.

Механизм интеграции геномов SV40 и вируса РУ исследован недостаточно подробно, однако на эту тему накоплена обширная информация. Во-первых, в вирусном геноме нет специфического сайта интеграции. Во-вторых, когда с помощью молекулярного клонирования интегрированных вирусных геномов удалось определить последовательность непосредственно в местах соединения клеточной и вирусной ДНК, выяснилось, что в большинстве случаев на этих участках нет ни повторяющихся или специфических последовательностей, ни участков гомологии с фрагментами вирусной хромосомы. Таким образом, в отличие от провирусной интеграции ретровирусов в данном случае в интегрированном вирусном геноме отсутствуют структурные элементы, характерные для транспозонов. Более того, такие данные позволяют исключить участие гомологичной рекомбинации в процессе интеграции. В-третьих, ни в одном из исследованных геномов клеток-хозяев не было найдено специфических сайтов интеграции, однако в месте интеграции были обнаружены значительные де-

лации хозяйской ДНК [160]. Следовательно, процесс интеграции может иметь форму делеционного или инсерционного мутагенеза. В целом имеющиеся данные отчетливо показывают, что механизм интеграции состоит в «незаконной» негомологичной реципрокной рекомбинации, происходящей, по-видимому, в случайных местах.

Трансформация, вызываемая SV40 и вирусом РУ, не отличается эффективностью. В конечном итоге устойчивыми трансформантами становится лишь малая доля зараженных клеток. И хотя большая часть оставшихся зараженных клеток на короткое время приобретает трансформированный фенотип, через некоторое время они теряют и вирусные последовательности, и все заметные биологические аномалии [49, 177]. Следовательно, можно утверждать, что процесс стабильной интеграции нормально экспрессирующегося вирусного генома происходит с относительно низкой эффективностью. В некоторых клетках грызунов блокирование эффективной трансформации SV40 происходит на уровне интеграции, хотя возможны и другие варианты [93, 94]. Кроме того, Базилко с соавторами [5] показали, что в трансформированных клетках крысы, содержащих полную копию вирусной ранней области, интактный большой Т-антиген вируса РУ может способствовать дестабилизации интегрированного генома и появлению клеток, которые утратили трансформированный фенотип и вирусный геном. Здесь следует отметить, что Сэмбрук и Ботчан с соавторами [27, 138, 139] показали, что в некоторых трансформированных клетках действие большого Т-антигена SV40 приводит к выщеплению вирусной хромосомы из места интеграции; этот процесс, по-видимому, связан с репликацией вирусного генома *in situ*, начинающейся на интактном участке начала репликации. Вследствие рекомбинации между фрагментами новосинтезированных клеточных фланкирующих последовательностей, расположенных по обеим сторонам новосинтезированной вирусной ДНК, появляются неинтегрированные сверхспиральные кольцевые химерные структуры, состоящие из клеточной и вирусной ДНК [27, 138, 139]. Предполагают, что в результате внутри- и (или) межмолекулярной рекомбинации возникают свободные интактные копии вирусной ДНК. Не исключено, что благодаря работе именно этого механизма в трансформированных вирусом SV40 клетках после их слияния с клетками обезьян появляется инфекционный вирус. На основании этих данных предложена модель, согласно которой для стабилизации интегрированного набора вирусных последовательностей, содержащих участок начала репликации, требуется инактивация способности большого Т-антигена инициировать автономную репликацию и (или) отсутствие одного или нескольких клеточных факторов пермиссивности, необходимых для

автономного синтеза вирусной ДНК. В особенности это относится к клеткам, которые полностью непермиссивны в отношении репликации вирусной ДНК. Следует отметить, что по крайней мере на одном типе трансформированных SV40 клеток человека (SV80) было показано, что в них синтезируется интактная форма большого Т-антигена, который в результате точечной мутации стал не способен к эффективной инициации репликации вирусной ДНК [62]. Описаны и другие подобные трансформанты клеток человека. Поскольку клетки человека являются полупермиссивными для синтеза вирусной ДНК, такая инактивация функции большого Т-антигена в репликации должна приводить к защите потенциального трансформанта от летального действия автономной репликации вирусного генома.

В конечном итоге ясно, что в установлении трансформированного фенотипа непермиссивных клеток участвует большой Т-антиген и того и другого вируса (SV40 и PY) [16, 49, 50, 116, 168]. Одна из интерпретаций полученных результатов состоит в том, что большой Т-антиген вызывает интеграцию паповавирусов. Если это так, то возможны два общих механизма этого процесса. В первом из них большой Т-антиген принимает непосредственное участие, а во втором он действует косвенным образом. Однозначных доказательств того, что большой Т-антиген непосредственно вызывает интеграцию вирусной ДНК, пока нет. Безуспешными оказались попытки обнаружить связанную с большим Т-антигеном нуклеазную и ДНК-полимеразную активности. Однако известно, что большой Т-антиген может стимулировать синтез клеточной ДНК в клетках, покоящихся в фазе G<sub>1</sub>, и он же, по-видимому, запускает синтез большого числа ферментов, принимающих участие в метаболизме нуклеотидов и в синтезе ДНК и РНК [40, 176]. В этом случае напрашивается предположение, что действие большого Т-антигена вызывает накопление белков, участвующих в процессах репарации и(или) рекомбинации ДНК, что приводит в конечном итоге к увеличению вероятности «незаконной» рекомбинации между хозяйской ДНК и неинтегрированными элементами. Отсюда следует, что действие большого Т-антигена в процессе трансформации частично заключается в индукции синтеза клеточных белков, необходимых для осуществления случайной межмолекулярной рекомбинации.

#### Литература

1. Acheson N. H. (1976). Transcription during productive infection with polyoma virus and simian virus 40, Cell, 8, 1—12.
2. Alwine J. (1982). Evidence for simian virus 40 late transcriptional control: Mixed infections of wild-type simian virus 40 and a late leader deletion mutant exhibit *trans* effect on late viral RNA synthesis, J. Virol., 42, 798—803.



3. *Anderson J. L., Martin R. G., Chang C., Mora P. T., Livingston D. M.* (1977). Nuclear preparations of SV40 transformed cells contain tumor-specific transplantation antigen activity, *Virology*, **76**, 420—425.
4. *Banerji J., Rusconi S., Schaffner W.* (1981). Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 sequences, *Cell*, **27**, 299—308.
5. *Basilico C., Zouzas D., Della-Valle G., Gattoni S., Colantuoni V., Fenton R., Dailey L.* (1979). Integration and excision of polyoma virus genomes, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 611—620.
6. *Benjamin T. L.* (1970). Host range mutants of polyoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 394—399.
7. *Benoist C., Chambon P.* (1981). The SV40 early promoter region: Sequence requirements in vivo, *Nature*, **290**, 304—310.
8. *Bergsma D., Olive D., Hartzell S., Subramanian K.* (1982). Territorial limits and functional anatomy of the simian virus 40 replication origin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 381—385.
9. *Bikel I., Roberts R. M., Blaton M. T., Green R., Amann E., Livingston D. M.* (1983). Purification of biologically active SV40 small t antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 906—910.
10. *Birg F., Dulbecco R., Fried M., Kamen R.* (1979). State and organization of polyoma virus DNA sequences in transformed rat cell lines, *J. Virol.*, **29**, 633—643.
11. *Bouck N., Beales N., Shenk T., Berg P., di Mayorca G.* (1978). New region of simian virus 40 genome required for efficient viral transformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2473—2477.
12. *Bourachot B., Herbolme P., Amati P., deCrombrughe B., Cereghini S., Yaniv M.* (1983). Polyoma and SV40 enhancers: Sequence variability and effect on chromatin structure in enhancers and eukaryotic expression. In: *Current Communications in Molecular Biology*, pp. 68—73, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
13. *Bradley M. K., Griffin J. D., Livingston D. M.* (1982). Relationship of oligomerization to enzymatic and DNA-binding properties of the SV40 large T antigen, *Cell*, **28**, 125—134.
14. *Bradley M. K., Hudson J., Villaneuva M. S., Livingston D. M.* (1984). Specific in vitro adenylation of the simian virus 40 large tumor antigen (in press).
15. *Brady J., Bolen J., Radonovich M., Salzman N., Khoury G.* (1984). Stimulation of simian virus 40 late gene expression by SV40 T antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2040—2044.
16. *Brugge J. S., Butel J. S.* (1975). Role of simian virus 40 gene A function in maintenance of transformation, *J. Virol.*, **15**, 619—635.
17. *Campo M., Cameron I., Rogers M.* (1979). Tandem integration of complete and defective SV40 genomes in mouse-human somatic cell hybrids, *Cell*, **15**, 1411—1422.
18. *Carmichael G., Dorsky D., Oliver D., Schaffhausen B., Benjamin T. L.* (1982). Carboxy terminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities and cell transformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3579—3583.
19. *Chang C., Martin R. G., Livingston D. M., Luborsky S. W., Hu C.-P., Mora P. T.* (1979). Relationship between T-antigen and tumor-specific transplantation antigen in simian virus-40 transformed cells, *J. Virol.*, **29**, 69—75.
20. *Chen M., Birkenmeier E., Salzman N.* (1976). SV40 DNA replication: Characterization of gaps in the termination region, *J. Virol.*, **17**, 614—619.
21. *Chia W., Rigby P. W. J.* (1981). Fate of viral DNA in non-permissive cells infected by temperature sensitive mutants of simian virus 40, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6638—6642.



22. Chou J., Avila J., Martin R. (1974). Viral DNA synthesis in cells infected by temperature sensitive mutants of simian virus 40, *J. Virol.*, **14**, 116—128.
23. Clark R., Lane D. P., Tjian R. (1981). Use of monoclonal antibodies as probes of simian virus 40 T antigen ATPase activity, *J. Biol. Chem.*, **256**, 11854—11858.
24. Clayton C. E., Murphy D., Lovett M., Rigby P. W. J. (1982). A fragment of the SV40 large T antigen gene transforms, *Nature*, **299**, 59—61.
25. Colby W. A., Shenk T. (1982). Fragments of the simian virus 40 transforming gene facilitate transformation of rat embryo cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5189—5193.
26. Cole C. Personal communication.
27. Conrad S. E., Liu C.-P., Botchan M. (1982). Fragment spanning the SV40 replication origin is the only DNA sequence required in *cis* for viral excision, *Science*, **218**, 1223—1225.
28. Contreras R., Gagysen D., Knowland J., Van de Voorde A., Fries W. (1982). Evidence for involvement of DNA replication origin and synthesis of late SV40 RNA, *Nature*, **300**, 500—505.
29. Cosman D. J., Tevethia M. J. (1981). Characterization of a temperature-sensitive, DNA-positive, non-transforming mutant of simian virus 40, *Virology*, **112**, 605—624.
30. Courhneige S., Smith A. E. (1983). Polyoma virus transforming protein associates with the product of the *c-src* cellular gene, *Nature*, **303**, 435—439.
31. Cowan K., Tegtmeyer P., Anthony D. D. (1973). Relationship of replication and transcription of simian virus 40 DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1927—1930.
32. Cowie A., Jat P., Kamen R. (1982). Determination of sequences at the capped 5' ends of polyoma virus early region transcripts synthesized in vivo and in vitro demonstrates an unusual microheterogeneity, *J. Mol. Biol.*, **59**, 225—255.
33. Crawford L. V., Pim D. C., Gurney F. G., Goodfellow P., Taylor-Papadimitriou J. (1981). Detection of a common feature in several human tumor cell lines — A 53,000 dalton protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 41—45.
34. Dandolo L., Blandy D., Kamen R. (1983). Regulation of polyoma virus transcription in murine embryonal carcinoma cells, *J. Virol.*, **47**, 55—64.
35. DeLucia A., Lewton B., Tjian R., Tegtmeyer P. (1983). Topography of simian virus 40 A protein-DNA complexes: Arrangement of pentanucleotide interaction sites at the origin of replication, *J. Virol.*, **46**, 143—150.
36. Deppert W., Hanke K., Henning R. (1980). Simian virus 40 T-antigen related cell surface antigen: Serological demonstration on simian virus 40-transformed monolayer cells in situ, *J. Virol.*, **35**, 505—518.
37. de Villiers J., Schaffner W. (1981). The small segment of polyoma virus DNA enhances the expression of a cloned rabbit beta-globin gene over a distance of at least 1400 base pairs, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6251—6256.
38. Dilworth S., Cowie A., Kamen R., Griffin B. (1984). DNA binding activity of polyoma virus large tumor antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1941—1945.
39. DiPamphilis M., Wasserman P. (1982). Organization and replication of papovavirus DNA. In: *Organization and Replication of Viral DNA*, ed. by A. S. Kaplan, pp. 37—114, CRC Press, Boca Raton, Fla.
40. Dulbecco R., Hartwell L., Vogt M. (1965). Induction of cellular DNA synthesis by polyoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **53**, 403—408.
41. Eckhart W., Hutchinson M. A., Hunter T. (1979). An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates, *Cell*, **18**, 925—934.
42. Ellman M., Bikel I., Livingston D. M. Unpublished observations.

43. *Ellman M., Bikel I., Figge J., Roberts T. M., Schlossman R., Livingston D. M.* (1984). The SV40 small t antigen is localized in both the nucleus and the cytoplasm, *J. Virol.*, **50**, 623—628.
44. *Everett R., Baty D., Chambon P.* (1983). The repeated GC-rich motifs upstream from the TATA box are important elements of the SV40 early promoter, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2447—2464.
45. *Fanning E., Nowak B., Burger C.* (1981). Detection and characterization of multiple forms of simian virus 40 large T antigen, *J. Virol.*, **37**, 92—102.
46. *Ferdinand F. J., Brown M., Khoury G.* (1977). Synthesis and characterization of late lytic simian virus 40 RNA from transcriptional complexes, *Virology* **78**, 150—161.
47. *Feunteun J., Sompayrac L., Fluck M., Benjamin T. L.* (1976). Localization of gene functions of polyoma virus DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4169—4173.
48. *Fiers W., Contreras R., Haegeman G., Rogiers R., Van De Voorde A., Van Heuverswyn H., Van Herreweghe J., Volckaert G., Ysebaert M.* (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA, *Nature*, **273**, 113—120.
49. *Fluck M. M., Benjamin T. L.* (1979). Comparisons of two early gene functions essential for transformation in polyoma virus and SV40, *Virology*, **96**, 205—228.
50. *Fried M.* (1965). Cell transforming ability of a temperature-sensitive mutant of polyoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **53**, 486—491.
51. *Frisque R. J., Rifkin J. D., Topp W.* (1980). Requirement for the large T and small T proteins of SV40 in the maintenance of the transformed state, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 325—332.
52. *Fromm M., Berg P.* (1982). Deletion mapping of DNA region required for SV40 early region promoter function in vivo, *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 457—481.
53. *Fromm M., Berg P.* (1983). Simian virus 40 early and late region promoter functions are enhanced by the 72 base pair repeat inserted at distant locations and inverted orientations, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 991—999.
54. *Fujimura F., Deininger P., Friedmann T., Linney E.* (1981). Mutation near the polyoma DNA replication origin permits productive infection of F9 embryonal carcinoma cells, *Cell*, **23**, 809—814.
55. *Garcea R., Benjamin T.* (1983). Host range transforming gene of polyoma virus plays a role in virus assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3613—3617.
56. *Gaudray P., Clertant P., Cuzin F.* (1980). ATP phosphohydrolase (ATPase) activity of a polyoma virus T antigen, *Eur. J. Biochem.*, **109**, 533—545.
57. *Gaudray P., Tindall C., Kamen R., Cuzin F.* (1981). The high affinity binding site on polyoma virus DNA for the viral large T protein, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 5697—5710.
58. *Ghosh P., Lebowitz P.* (1981). SV40 early mRNAs contain multiple 5' termini upstream and downstream from a Hogness-Goldberg sequence. A shift in 5' termini during the lytic cycle is mediated by large T antigen, *J. Virol.*, **40**, 224—240.
59. *Ghosh P., Lebowitz P., Frisque F., Gluzman Y.* (1981). Identification of a promoter component involved in positioning the 5' termini of SV40 early mRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 100—104.
60. *Ghosh P., Reddy V., Swinescoe J., Lebowitz P., Weissman S.* (1978). Heterogeneity and 5' terminal structure of the late RNAs of SV40, *J. Mol. Biol.*, **126**, 813—846.
61. *Giacherio D., Hager L. P.* (1979). A poly dT stimulated ATPase activity associated with SV40 large T antigen, *J. Biol. Chem.*, **254**, 8113—8116.
62. *Gish W., Botchan M.*, Personal communication.
63. *Gluzman Y., Ahrens B.* (1982). SV40 early mutants that are defective for

- viral DNA synthesis but competent for transformation of cultured rat and simian cells, *Virology*, **123**, 78—92.
64. *Goldman E., Benjamin T. L.* (1975). Analysis of host range of nontransforming polyoma virus mutants, *Virology*, **66**, 372—380.
  65. *Gooding L. R.* (1977). Specificities of killing by cytotoxic lymphocytes generated in vivo to syngeneic SV40 transformed cells, *J. Immunol.*, **118**, 920—927.
  66. *Graessmann A., Graessmann M., Tjian R., Topp W. C.* (1980). Simian virus 40 small t protein is required for loss of actin cable networks in rat cells, *J. Virol.*, **33**, 1182—1191.
  67. *Greenspan D. S., Carroll R. B.* (1981). Complex of simian virus 40 large tumor antigen and 48,000-dalton host tumor antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 105—109.
  68. *Griffin B. E.* (1981). Structure and genomic organization of SV40 polyoma virus. In: *DNA Tumor Viruses, Molecular Biology of Tumor Viruses*, ed. by J. Tooze, pp. 61—123, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
  69. *Griffin J. D., Spangler G., Livingston D. M.* (1979). Protein kinase activity associated with simian virus 40 T antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2610—2614.
  70. *Griffin J. D., Spangler G., Livingston D. M.* (1980). Enzymatic activities associated with the SV40 large T antigen, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 113—122.
  71. *Grosveld G., Rosenblatt A., Flavell R.* (1982). Sequence requirements for the transcription of the rabbit beta-globin gene in vivo, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 4951—4971.
  72. *Gruss P., Dhar R., Khoury G.* (1981). Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 943—947.
  73. *Hansen U., Sharp P. A.* (1983). Transcription by RNA polymerase II, *Comp. Virol.* (in press).
  74. *Hansen U., Tenen D. G., Livingston D. M., Sharp P. A.* (1981). T antigen repression of SV40 early transcription from overlapping promoters, *Cell*, **27**, 603—612.
  75. *Hartzell S., Yamaguchi J., Subramanian K.* (1983). SV40 deletion mutants lacking the 21 base pair repeated sequences are viable, but have noncomplementable deficiencies, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1601—1616.
  76. *Hay R., DePamphilis M.* (1982). Initiation of SV40 DNA replication in vivo: Location and structure of 5' ends of DNA synthesized in the ori region, *Cell*, **28**, 167—179.
  77. *Herbomel P., Saragosti S., Blangy D., Yaniv M.* (1981). Fine structure of the origin proximal DNase I hypersensitive region in wild type and EC mutant polyoma, *Cell*, **25**, 651—658.
  78. *Hiscott J. B., Defendi V.* (1979). Simian virus 40 gene A regulation of cellular DNA synthesis. I. In permissive cells, *J. Virol.*, **30**, 590—599.
  79. *Hiscott J. B., Defendi V.* (1981). Simian virus 40 gene A regulation of cellular DNA synthesis. II. In nonpermissive cells, *J. Virol.*, **37**, 802—812.
  80. *Ito Y., Brocklehurst J. R., Dulbecco R.* (1977). Virus-specific proteins in the plasma membrane of cells lytically infected or transformed by polyoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4666—4670.
  81. *Jat P., Roberts J., Cowie A., Kamen R.* (1982). Comparison of the polyoma early and late promoters by transcription in vitro, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 871—887.
  82. *Jay G., Nomura S., Anderson C. W., Khoury G.* (1981). Identification of the SV40 agno gene product: A DNA binding protein, *Nature*, **291**, 346—349.
  83. *Jones K., Tjian R.* (1984). Essential contact residues with an SV40 large T



- antigen binding sites I and II identified by alkylation interference, *Cell*, **36**, 155—162.
84. *Kadesch T., Berg P.* (1983). Effects of the position of the 72 base pair enhancer segment on transcription from the SV40 early region promoter. In: *Enhancers and Eukaryotic Gene Expressions, Communications in Molecular Biology*, pp. 21—27, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
  85. *Kalderon D., Smith A. E.* Personal communication.
  86. *Kamen R.* Personal communication.
  87. *Kamen R., Jat P., Treisman R., Favalaro J.* (1982). 5' termini of polyoma virus early region transcripts synthesized in vivo by wild type virus and viable deletion mutants, *J. Mol. Biol.*, **159**, 189—224.
  88. *Katinka M., Yaniv M.* (1980). Expression of polyoma early functions in mouse embryonal carcinoma cells depends on sequence rearrangements in the beginning of the late region, *Cell*, **20**, 393—399.
  89. *Katinka M., Vasseur M., Montreau N., Yaniv M., Blangy D.* (1981). Polyoma DNA sequences involved in controlled viral gene expression in murine embryonal carcinoma cells, *Nature*, **290**, 720—722.
  90. *Keller J. M., Alwine J. C.* (1984). Activation of the SV40 late promoter: Direct effects of T antigen in the absence of viral DNA replication, *Cell*, **36**, 381—389.
  91. *Khoury G., May E.* (1977). Regulation of early and late simian virus 40 transcription: Overproduction of early viral RNA in the absence of a functional T antigen, *J. Virol.*, **23**, 167—176.
  92. *Khoury G., Gruss P.* (1983). Enhancer elements, *Cell*, **33**, 313—314.
  93. *Kriegler M., Botchan M.* Personal communication.
  94. *Kriegler M., Perez C., Hardy C., Botchan M.* (1984). Viral integration and early gene expression both affect the efficiency of SV40 induced transformation of murine cells. Biochemical and biological characterization of an SV40 retrovirus. In: *Cancer Cells, Vol. 2, Oncogenes and Viral Genes*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
  95. *Lane D. P., Crawford L. V.* (1979). Large-T antigen is bound to a host cell protein in SV40 transformed cells, *Nature*, **278**, 261—263.
  96. *Lania L., Heyday A., Bjursell G., Gandini-Attardi D., Fried M.* (1979). Organization and expression of integrated polyoma virus DNA sequences in transformed rodent cells, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 597—603.
  97. *Legon S., Flavell A., Cowie A., Kamen R.* (1979). Amplification in the leader sequence of late polyoma virus mRNA, *Cell*, **16**, 373—388.
  98. *Lewis A. M., Jr., Martin R. G.* (1979). Oncogenicity of simian virus 40 deletion mutants that induce altered 17-kilodalton t-protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4299—4302.
  99. *Linzer D. I. H., Levine A. J.* (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells, *Cell*, **17**, 43—52.
  100. *Linzer D. I. H., Malzman W., Levine A. J.* (1979). *Virology*, **98**, 308—318.
  101. *Lusky M., Berg L., Weiher H., Botchan M.* (1983). Bovine papilloma virus contains an activator of gene expression at the distal end of the early transcription unit, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1108—1122.
  102. *Margolskee R. F., Nathans D.* (1984). Simian virus 40 mutant T antigens with relaxed specificity for the nucleotide sequence at the viral DNA origin of replication, *J. Virol.*, **49**, 386—393.
  103. *Martin R. G., Chou J. Y.* (1975). Simian virus 40 functions required for the establishment and maintenance of malignant transformation, *J. Virol.*, **15**, 599—612.
  104. *Martin R. G., Petit Setlow V., Edwards C. A. F., Vembu D.* (1979). The



- roles of the simian virus 40 tumour antigens in transformation of Chinese hamster lung cells, *Cell*, **17**, 635—643.
105. *Martin R., Setlow V.* (1980). The initiation of SV40 DNA synthesis is not unique to the replication origin, *Cell*, **20**, 381—391.
  106. *Mathis D., Chambon P.* (1981). The SV40 early region TATA box is required for accurate in vitro initiation of transcription, *Nature*, **290**, 310—315.
  107. *Mattern C. F., Takemoto K. K., Daniel W. A.* (1966). Replication of polyoma virus in mouse embryo cells: Electron microscopic observations, *Virology*, **30**, 242—249.
  108. *McCormick F., Harlow E.* (1980). Association of a murine 53,000-dalton phosphoprotein with simian virus 40 large T antigen in transformed cells, *J. Virol.*, **34**, 213—224.
  109. *McKnight S., Kingsbury R.* (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene, *Science*, **217**, 316—324.
  110. *Montenarh M., Henning R.* (1983). Self-assembly of simian virus 40 large T antigen oligomers by divalent cations, *J. Virol.*, **45**, 531—538.
  111. *Moreau P., Hen R., Waslyk E., Everett R., Gaub M., Chambon P.* (1981). The SV40 72 base pair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6047—6068.
  112. *Muller W., Mueller C., Mes A., Hassell J.* (1983). The polyoma virus origin for DNA replication is comprised of multiple genetic elements, *J. Virol.*, **47**, 586—599.
  113. *Murphy C. I., Bikel I., Livingston D. M.* (1984). Cellular proteins which can specifically associate with simian virus 40 small t antigen, *J. Virol.* (in press).
  114. *Myers R. M., Tjian R.* (1980). Construction and analysis of simian virus 40 origins defective in tumor antigen binding and DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6491—6495.
  115. *O'Farrell P. Z., Goodman H. M.* (1976). Resolution of simian virus 40 proteins in whole cell extracts by two-dimensional electrophoresis: Heterogeneity of the major capsid protein, *Cell*, **9**, 289—298.
  116. *Osborn M., Weber K.* (1975). Simian virus 40 gene A function and maintenance of transformation, *J. Virol.*, **15**, 636—644.
  117. *Osborn M., Weber K.* Personal communication.
  118. *Ozer H. L., Takemoto K. K.* (1969). Site of host restriction of simian virus 40 mutants in an established African green monkey kidney line, *J. Virol.*, **4**, 408—415.
  119. *Parker B. A., Stark G. R.* (1979). Regulation of simian virus 40 transcription: Sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA, *J. Virol.*, **31**, 360—369.
  120. *Petit C. A., Gardes M., Feunteun J.* (1983). Immortalization of rodent embryo fibroblasts by SV40 is maintained by the A gene, *Virology*, **127**, 74—82.
  121. *Pipas J. M., Reden K. W. C., Nathans D.* (1983). Mutational analysis of simian virus 40 T antigen: Isolation and characterization of mutants with deletions in the T-antigen gene, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 203—213.
  122. *Pomerantz B., Hassel J.* (1984). Polyoma virus and simian virus 40 large T antigens bind to common DNA sequences, *J. Virol.*, **49**, 925—937.
  123. *Pope J. H., Rowe W. P.* (1964). Detection of specific antigen in SV40-transformed cells by immunofluorescence, *J. Exp. Med.*, **120**, 121—128.
  124. *Prives C., Gilboa E., Revel M., Winnocour E.* (1977). Cell-free translation of simian virus 40 early messenger RNA coding for viral T antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 457—461.
  125. *Prives C., Beck Y., Gidoni D., Oren M., Shure H.* (1980). DNA binding A sedimentation properties of SV40 T antigen synthesized in vitro and in vivo, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 123—130.

126. Rassoulzadegan M., Cowie A., Carr A., Gliachenhaus N., Kamen R., Cuzin F. (1982). The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation, *Nature*, **300**, 713—718.
127. Reddy V. B., Tevethia S. S., Tevethia M. J., Weissman S. M. (1982). Non-selective expression of simian virus 40 large tumor antigen fragments in mouse cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2064—2067.
128. Reddy V. B., Thimmappaya B., Dhar R., Subramanian K. N., Zain B. S., Pan J., Ghosh P. K., Celma M. L., Weissman S. M. (1978). The genome of simian virus 40, *Science*, **200**, 494—502.
129. Reed S. I., Stark G. R., Alwine J. C. (1976). Autoregulation of simian virus 40 gene A by T antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3083—3088.
130. Rio D., Tjian R. (1983). SV40 T antigen binding site mutations that affect autoregulation, *Cell*, **32**, 1227—1240.
131. Rio D., Tjian R. Personal communication.
132. Rio D., Robbins A., Meyers R., Tjian R. (1980). Regulation of simian virus 40 early transcription in vitro by a purified tumor antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5706—5710.
133. Rubin H., Figge J., Bladon M. T., Chen L. B., Ellman M., Bikel I., Farrell M. P., Livingston D. M. (1982). Role of small t antigen in the acute transforming activity of SV40, *Cell*, **30**, 469—480.
134. Ruley H. E., Fried M. (1983). Sequence repeats in a polyoma virus DNA region important for gene expression, *J. Virol.*, **47**, 233—237.
135. Rundell K. (1982). Presence in growth-arrested cells of cellular proteins that interact with simian virus 40 small t antigen, *J. Virol.*, **42**, 1135—1137.
136. Rundell K., Cox J. (1979). Simian virus 40 t antigen affects the sensitivity of cellular DNA synthesis to theophylline, *J. Virol.*, **30**, 394—396.
137. Rundeell K., Major E. O., Lampert M. (1981). Association of cellular 56,000 and 32,000 molecular weight proteins with BK virus and polyoma virus t-antigens, *J. Virol.*, **37**, 1090—1093.
138. Sambrook J. Personal communication.
139. Sambrook J., Greene R., Stringer J., Mitcheson T., Hu S.-L., Botchan M. (1979). Analysis of the sites of integration of viral DNA sequences in rat cells transformed by adenovirus 2 or SV40, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 569—583.
140. Santos M., Butel J. S. (1982). Association of SV40 large tumor antigen and cellular proteins on the surface of SV40 transformed mouse cells, *Virology*, **120**, 1—17.
141. Saragosti S., Moine G., Yaniv M. (1980). Absence of nucleosomes in a fraction of SV40 chromatin in the origin of replication in the region coding for the late leader RNAs, *Cell*, **20**, 65—73.
142. Schaffhausen B., Benjamin T. L. (1981). Comparison of phosphorylation of two polyoma virus middle T antigens in vivo and in vitro, *J. Virol.*, **40**, 184—196.
143. Schaffhausen B., Silver J., Benjamin T. L. (1978). Tumor antigens in cells productively infected by wild-type polyoma virus and mutant, NG-18, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 79—83.
144. Scheidtmann K. H., Echle B., Walter G. (1982). Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions, *J. Virol.*, **44**, 116—133.
145. Scheidtmann K. H., Hardung M., Echle B., Walter G. (1984). DNA-binding activity of simian virus 40 large T antigen correlates with a distinct phosphorylation state, *J. Virol.*, **50**, 1—12.
146. Scherneck S., Bottger M., Feunteun J. (1979). Studies on the DNA of an oncogenic papovavirus of the Syrian hamster, *Virology*, **96**, 100—107.
147. Scott W., Wigmore D. (1978). Sites in SV40 chromatin which are preferentially cleaved by endonucleases, *Cell*, **15**, 1511—1518.

148. Seif R., Cuzin F. (1975). Temperature-sensitive growth regulation in one type of transformed rat cells induced by the ts A mutant of polyoma virus, *J. Virol.*, **24**, 721—728.
149. Seif R., Martin R. (1979). Simian virus 40 small t antigen is not required for the maintenance of transformation but may act as a promoter (cocarcinogen) during establishment of transformation in resting rat cells, *J. Virol.*, **32**, 979—988.
150. Seif I., Khoury G., Dhar R. (1979). The genome of human papovavirus KBV, *Cell*, **18**, 963—977 [see also *Cell*, **19**(2) (1980). errata].
151. Sekikawa K., Levine A. (1981). Isolation and characterization of polyoma host-range mutants that replicate in nullipotent embryonal carcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1100—1104.
152. Shalloway D., Kleinberger T., Livingston D. M. (1980). Mapping of SV40 replication origin region binding sites for the SV40 T antigen by protection against exonuclease III digestion, *Cell*, **20**, 411—422.
153. Shenk T. E., Carbon J., Berg P. (1976). Construction and analysis of viable deletion mutants of simian virus 40, *J. Virol.*, **18**, 664—671.
154. Shortle D. R., Margolskee R. F., Nathans D. (1979). Mutational analysis of the simian virus 40 replicon: Pseudorevertants of mutants with a defective replication origin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6128—6131.
155. Silbert P., Eckhart W., Linney E. (1981). Polyoma virus infection of retinoic acid induced differentiated teratocarcinoma cells, *J. Virol.*, **39**, 306—312.
156. Slegel M. J., Topp W. C., Hanick R., Sambrook J. F. (1978). Mutants of SV40 with an altered small t protein are reduced in their ability to transform cells, *Cell*, **14**, 79—88.
157. Soule H. R., Butel J. S. (1979). Subcellular localization of simian virus 40 large tumor antigen, *J. Virol.*, **30**, 523—532.
158. Stahl H., Knippers R. (1983). Simian virus 40 large T antigen on replicating viral chromatin: Tight binding and localization on the viral genome, *J. Virol.*, **47**, 65—76.
159. Staneloni R., Fluck M., Benjamin T. L. (1977). Host range selection of transformation-defective hr-t mutants of polyoma virus, *Virology*, **77**, 598—609.
160. Stringer J. R. (1982). DNA sequence homology and chromosomal deletion at a site of SV40 DNA integration, *Nature*, **296**, 363—366.
161. Stringer J. R. (1982). Mutant of simian virus 40 large T antigen that is defective for viral DNA synthesis, but competent for transformation of cultured rat cells, *J. Virol.*, **42**, 854—864.
162. Sundin O., Varshavsky A. Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiple intertwined catenated dimers, *Cell*, **21**, 103—114.
163. Tanaka K., Chowdhury K., Chang K., Israel M., Ito Y. (1982). Isolation and characterization of polyoma virus mutants which grow in a murine embryonal carcinoma and trophoblast cells, *EMBO J.*, **1**, 1521—1527.
164. Tapper D., DePamphilis M. (1978). Discontinuous DNA replication: Accumulation of SV40 DNA at specific stages of its replication, *J. Mol. Biol.*, **120**, 401—412.
165. Tarnow J., Cole C. N. (1983). Nonviable mutants of SV40 with deletions near the 3' end of gene A define a function for large T antigen required after onset of viral DNA replication, *J. Virol.*, **47**, 487—493.
166. Tegtmeyer P. (1972). Simian virus 40 deoxyribonucleic acid synthesis: The viral replicon, *J. Virol.*, **10**, 591—598.
167. Tegtmeyer P. Personal communication.
168. Tegtmeyer P., Schwartz M., Collins J. K., Rundell K. (1975). Function of simian virus 40 gene A in transforming infection, *J. Virol.*, **15**, 613—618.
169. Tegtmeyer P., Schwartz M., Collins J. K., Rundell K. (1975). Regulation of tumor antigen synthesis by simian virus 40 gene A, *J. Virol.*, **16**, 168—178.



170. *Tenen D., Haines L., Livingston D. M.* (1982). Binding of an analog of the SV40 T antigen to wild type and mutant viral replication origins, *J. Mol. Biol.*, **157**, 473—492.
171. *Tevethia S. S., Flyer D. C., Tjian R.* (1980). Biology of simian virus 40 (SV40) transplantation antigen (TrAg). VI. Mechanism of induction of SV40 transplantation immunity in mice by purified SV40 T antigen (D2 protein), *Virology*, **107**, 13—23.
172. *Tevethia S. S., Blasecki J. W., Waneck G., Goldstein A. L.* (1974). Requirement of thymus-derived O-positive lymphocytes for rejection of DNA virus (SV40) tumors in mice, *J. Immunol.*, **113**, 1417—1423.
173. *Tjian R.* (1978). The binding site on SV40 DNA for a T antigen-related protein, *Cell*, **13**, 165—179.
174. *Tjian R., Robbins A.* (1979). Enzymatic activities associated with a purified simian virus T antigen-related protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 610—615.
175. *Tjian R., Fey G., Graessmann A.* (1978). Biological activity of purified SV40 T antigen proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1279—1283.
176. *Tooze J. (Ed.)* (1973). *The Molecular Biology of Tumor Viruses*, pp. 321—329, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
177. *Tooze J. (Ed.)* (1981). *DNA Tumor Viruses, Molecular Biology of Tumor Viruses*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
178. *Tyndall C., LaMantia G., Thacker C., Favolaro J., Kamen R.* (1981). A region of the polyoma virus genome between the replication origin and the protein coding sequences is required in cis for both early gene expression and viral DNA replication, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6231—6250.
179. *Vasseur M., Katinka M., Herbomel P., Yaniv M., Blangy D.* (1982). Physical and biological features of polyoma virus mutants able to infect embryonal carcinoma cell lines, *J. Virol.*, **43**, 800—808.
180. *Wasylyk B., Wasylyk C., Augereau P., Chambon P.* (1983). The SV40 72 base pair repeat preferentially potentiates transcription starting from proximal natural or substitute promoter elements, *Cell*, **32**, 503—514.
181. *Yang R. C., Wu R.* (1979). BK virus DNA: Complete nucleotide sequence of a human tumor virus, *Science*, **206**, 456—461.
182. *zur Hausen H., Gissmann L.* (1979). Lymphotropic papovavirus isolated from African green monkey and human cells, *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*, **167**, 137—143.



## Репликация парвовирусов

*Кеннет И. Бернс, Николас Музычка, Вильям В. Хаусвирт<sup>1</sup>*

Парвовирусы являются одними из самых мелких ДНК-содержащих вирусов животных. Их вирион имеет в диаметре 18—26 нм и состоит только из белка и ДНК. В сем. Parvoviridae входят три рода: парвовирусы, депендовirus (адено-ассоциированные вирусы) и денсовирусы (вирус денсонуклеоза) [5]. Представители первых двух родов широко распространены среди теплокровных животных, начиная от домашней птицы и кончая человеком (табл. 27.1). Адено-ассоциированные вирусы (AAV) уникальны среди вирусов животных в том отношении, что для их продуктивной инфекции необходимо совместное заражение с неродственным вирусом-помощником, таким, как аденовирус или вирус простого герпеса [4, 16, 51, 91]. Наряду с этими различиями у автономных парвовирусов и AAV есть много общего в строении геномов, их организации и экспрессии. В этой главе мы сравним репликацию этих двух родов на молекулярном и биологическом уровнях. Составляющие третий род вирусы денсонуклеоза выделены только из Lepidoptera и Orthoptera. Поскольку по спектру хозяев эти вирусы не входят в число тех, которым посвящена данная книга, и поскольку вопрос об их принадлежности к Parvoviridae все еще остается открытым, их репликацию мы не будем рассматривать. Читатели, которых интересуют вирусы денсонуклеоза, могут обратиться к работе [62].

### Вирион

Вирион парвовирусов имеет относительно простую структуру и состоит только из трех белков и линейной одноцепочечной молекулы ДНК. Вирусные частицы обладают икосаэдрической симметрией и имеют диаметр 18—26 нм. Выяснение детальной структуры вирионов оказалось очень трудной задачей, и ничего, кроме этих основных фактов, методами электронной микроско-

---

<sup>1</sup> *Kenneth I. Berns, Nicholas Muzyczka, William W. Hauswirth*, Department of Immunology and Medical Microbiology, University of Florida, College of Medicine, Gainesville, Florida 32610.

Таблица 27.1. Parvoviridae

Род Parvovirus	Род Dependovirus (адено-ассоциированные вирусы)
Вирус крыс Вирус H1 Вирус H3 Мелкий вирус мышей Парвовирус свиней  Парвовирус крупного рогатого скота Парвовирус кошек Парвовирус гусей Парвовирус кроликов TVX Вирус KBSH Lu III RT  <i>Предполагаемые члены рода:</i> Вирус гастроэнтерита человека (нор- окский агент) Вирус алеутской болезни норки Парвовирус кроликов Парвовирус собак Парвовирус человека (B-19)	AAV-1 AAV-2 AAV-3 AAV-4 Адено-ассоциированный вирус крупного рогатого скота (AAAV) <i>Предполагаемый член рода:</i> AAV лошадей

пии установить не удалось. В последних сообщениях Рабочей группы по парвовирусам Международного комитета по таксономии вирусов [5] утверждалось, что вирионы содержат 32 капсомера диаметром 3—4 нм. Однако из-за противоречивости литературных данных к этим оценкам следует относиться с некоторой осторожностью. В настоящее время нет воспроизводимых данных относительно ферментов вирусного или клеточного происхождения, связанных с вирионом. В одной из недавних работ [6] описано выделение при помощи мягкой экстракции [правда, не из вирионов, а из клеток, зараженных мелким вирусом мышей (MVM)] ДНК-гистоновых комплексов.

Вирусная частица имеет мол. массу  $(5,5-6,2) \cdot 10^6$ . Приблизительно 80% массы составляют белки, остальное — ДНК. Благодаря относительно высокому отношению ДНК/белок плавучая плотность интактного вириона в CsCl составляет 1,39—1,42 г/см<sup>3</sup>. Высокая плавучая плотность в CsCl позволяет при совместном заражении легко отделить AAV от аденовирусов-помощников. Описаны тяжелые и легкие формы вирионов. Последние содержат молекулы ДНК со значительными делециями; они могут участвовать в заражении в качестве дефектных интерферирующих частиц (ДИ-частиц) [29, 33, 50, 59, 85, 96, 118].

Точная причина появления вирионов, более тяжелых, чем обычные, неизвестна. ДНК, содержащаяся в более тяжелых вирионах, неотличима от ДНК нормальных вирионов, поэтому можно предполагать, что у первых утрачена часть белков. Неизвестно, составляют ли утраченные белки специфический набор. Коэффициент седиментации вирионов в нейтральном сахарозном градиенте равен 110—122 S.

Возможно, что именно вследствие своей простой структурной организации вирионы чрезвычайно устойчивы к инактивации. Они выдерживают pH от 3 до 9 и прогревание при 56°C в течение 1 ч. Инактивируются вирусы формалином,  $\beta$ -пропиолактоном, гидроксиламином и окисляющими агентами [5].

### Геном

Геном состоит из одной полинуклеотидной цепи с мол. массой  $(1,5-1,8) \cdot 10^6$  [27, 37]. Известны полные нуклеотидные последовательности ДНК автономных парвовирусов (MVM и H1) и депендовируса AAV-2 [3, 99, 111]. ДНК AAV содержит 4675 оснований, MVM — 5084 основания и H1 — 5176 оснований. Молекулы ДНК, упакованные внутри вирионов этих двух родов, имеют два основных различия. Первое заключается в том, что автономные парвовирусы содержат в вирионах цепи в основном только одной полярности ( $>99\%$ ), причем они комплементарны вирусным мРНК [13]. В противоположность этому в вирионах AAV содержатся цепи обеих полярностей (в каждом вирионе — какой-либо одной полярности) [8, 9, 81, 103]. Это различие не является абсолютным. Сиегл (G. Siegl, неопубликованные данные) недавно обнаружил, что при некоторых условиях автономный парвовирус Lu III также содержит цепи обеих полярностей с приблизительно одинаковой частотой.

Второе основное различие между вирионными ДНК этих двух родов касается структуры и организации концевых последовательностей. Геном автономного парвовируса имеет на 3'-конце вирионной цепи палиндромную, или симметричную, последовательность длиной около 115 оснований [2, 105]. Этот участок ДНК может сворачиваться в шпилечную структуру, которая поддерживается водородными связями между комплементарными последовательностями. В отличие от последовательности на 5'-конце вирионной цепи, которая может быть в любой из двух ориентаций, 3'-концевая последовательность является уникальной. (Значение такой организации для репликации ДНК обсуждается ниже.) Шпилечная структура, которая может образоваться на 3'-конце, имеет форму Y или T (рис. 27.1). Этот участок генома секвенирован для четырех автономных парвовирусов, и во всех случаях обнаружена подоб-



Рис. 27,1. Сравнение 3'-концевых нуклеотидных последовательностей и шпильчатых структур ДНК МВМ (*вверху*) и ААV-2 (*внизу*). Последовательности представлены в форме, соответствующей наиболее стабильной вторичной структуре.

ная структура, хотя сами последовательности могут различаться. Особый интерес вызывает тот факт, что почти все пары оснований, входящие в состав коротких ветвей Y- или T-образных структур, являются парами ГС.

Палиндромные 5'-концевые участки также могут образовывать шпильки, однако их последовательность совершенно не похожа на последовательность на 3'-конце вирионной цепи. Секвенированы 5'-концевые палиндромы ДНК МВМ и вируса Н1; они имеют длину 207 и 242 нуклеотида соответственно [3, 98]. Так же как и последовательность на 3'-конце, 5'-концевая последовательность не является совершенным палиндромом; здесь также есть короткие внутренние палиндромные последовательности. В отличие от 3'-концевой последовательности последовательность на 5'-конце не уникальна. Здесь с одинаковой вероятностью обнаруживаются последовательности двух типов, которые свидетельствуют об инверсии кондового сегмента генома. Эти последовательности возникают вследствие того, что 5'-концевая шпилька не абсолютно симметрична.

В отличие от ДНК автономных парвовирусов геном AAV имеет концевой инвертированный повтор длиной 145 оснований [69, 78]. Первые 125 оснований образуют палиндромную последовательность, которая при построении шпильки с максимальной



ным спариванием складывается в Y- или T-образную структуру, сильно напоминающую структуру, образующуюся на 3'-конце вирионной цепи ДНК автономных парвовирусов. Так же как и в случае ДНК автономных парвовирусов, концевую палиндромную последовательность ДНК AAV точнее можно представить в виде двух внутренних палиндромов (нуклеотиды 42—84), которые фланкированы более протяженным палиндромом (нуклеотиды 1—41 и 85—125). В свернутой конфигурации только семь оснований остаются неспаренными. Шесть нуклеотидов необходимы для того, чтобы могли сворачиваться внутренние палиндромы, седьмой находится в месте их соединения. В отличие от 3'-концевой последовательности автономных парвовирусов палиндромная часть концевого повтора AAV гетерогенна. Она включает последовательности двух типов, что отражает инверсию 125 концевых оснований. В этом отношении концевой повтор AAV больше похож на 5'-концевую палиндромную последовательность автономных парвовирусов. Поскольку внутренние палиндромы неидентичны (что приводит к отсутствию абсолютной симметрии концевых участков), здесь также инверсия приводит к наличию концевых последовательностей двух типов.

Кроме того, самые крайние основания имеют дополнительную гетерогенность. На 5'-конце ДНК AAV-2 находится последовательность 5'-TTG. Однако у 50% молекул, выделенных из вирионов, отсутствует первый T, а у 15% — нет обоих T [34].

В выяснении механизма репликации вирусной ДНК важную роль сыграли картирование при помощи ферментов рестрикции и секвенирование концевых последовательностей ДНК вирусов обоих родов. Поскольку конечный продукт репликации представляет собой зрелую вирионную ДНК, предлагаемая модель репликации должна объяснять организацию нуклеотидной последовательности, обнаруженную у вирионной ДНК. И наоборот, строение концевой последовательности может служить ключом для построения правильной модели. Так, различия в организации концевых последовательностей ДНК автономных парвовирусов и AAV заставили внести соответствующие поправки в модель репликации ДНК автономных парвовирусов, в общих чертах сходную с моделью репликации ДНК AAV, но имеющую свои особенности.

Во внутренней организации геномов вирусов обоих типов имеется еще одно сходство (рис. 27.2). Они имеют две большие неперекрывающиеся открытые рамки [3, 99, 111]; одна из них простирается от 0,05 ед. карты до 0,40 ед. карты, другая находится между 0,50 и 0,90 ед. карты. У MVM и вируса N1 эти две открытые рамки находятся в различных фазах, тогда как у AAV-2 они имеют одинаковую фазу. Как будет обсуждаться ниже, открытая рамка в правой половине генома, по-видимому,

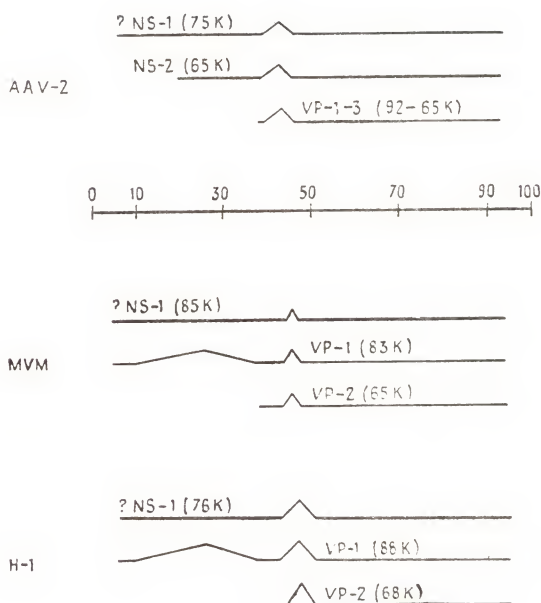


Рис. 27.2. Схемы транскрипции ДНК AAV-2, MVM и вируса H1. Показана локализация транскриптов (горизонтальные линии) и их интронов (наклонные линии). Приведены также открытые рамки, кодирующие вирусные капсидные белки (VP) и гипотетические неструктурные белки (NS); в скобках указана приблизительная молекулярная масса соответствующего белка.

кодирует все белки капсида; относительно открытой рамки в левой половине полагают, что она соответствует неструктурному белку (или белкам).

### Белки капсида

Вирионы автономных парвовирусов и AAV содержат три капсидных белка. У различных видов автономных парвовирусов эти белки имеют мол. массы приблизительно 85K (VP-1), 65K (VP-2) и 61K (VP-3) [68, 106]. Парвовирус крупного рогатого скота типа 1 является исключением, поскольку у него белки VP-2 и VP-3 имеют мол. массы 77K и 67K соответственно [56]. Мажорный белок VP-3 обычно составляет ~80% общей массы вирионных белков. Часто вирусные препараты вообще не содержат VP-2. По-видимому, относительное количество этого белка зависит от момента выделения вирионов в течение инфекции. Препараты Lu III при некоторых условиях культивирования содержат в заметном количестве лишь белок

VP-3 [79]. Все препараты AAV, охарактеризованные в настоящее время, содержат три капсидных белка: VP-1 (87K), VP-2 (73K) и VP-3 (62K) [58, 59, 104]. Ни для одного из родов парвовирусов нет данных о гликозилировании какого-либо белка капсида [57]. Определен аминокислотный состав белков капсида, характеризующийся относительно высоким содержанием кислотных аминокислот [58, 104]. Белки капсида AAV-2 содержат 10,6% глутамина и глутаминовой кислоты и 14,7% аспарагина и аспарагиновой кислоты. Однако до сих пор не удалось определить их аминокислотную последовательность. Эти белки плохо растворяются в водных растворах, а их N-конец заблокирован (F. B. Johnson, неопубликованные данные). Аминокислотная последовательность VP-3 рассчитана теоретически по последовательности ДНК AAV, и полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными [111].

Самые интересные свойства белков были выявлены при сравнении продуктов триптического расщепления. Все три белка каждого из вирусов дают в результате расщепления очень сходный набор пептидов; наблюдаются лишь небольшие различия [60, 117]. Это свидетельствует о том, что почти вся аминокислотная последовательность трех капсидных белков детерминруется одной и той же последовательностью ДНК. Это предположение подтвердили опыты по трансляции *in vitro* (см. ниже).

В дополнение к тому, что все три белка капсида парвовирусов, по-видимому, закодированы одной и той же последовательностью ДНК, недавно появилось сообщение еще об одном осложняющем моменте. В случае AAV-1 и AAV-2 капсидные белки VP-1 и VP-3 можно разделить с помощью электрофореза в полиакриламидном геле еще на несколько фракций [83], однако причина различий в подвижностях молекул пока неизвестна.

### Продуктивная инфекция

Автономные парвовирусы обладают довольно высокой специфичностью к хозяину, хотя некоторые вирусы хомячков были впервые выделены в качестве контаминирующих агентов из опухолей человека, растущих в лабораторных условиях [41], а MVM может расти на линиях трансформированных клеток как мышей, так и хомячков. Есть по крайней мере один случай высокой специфичности к клетке-хозяину — прототипный лабораторный штамм MVM [MVM(p)] растет только в клеточных линиях дифференцированных фибробластов [116]. Неспособность других линий дифференцированных клеток поддерживать рост MVM проявляется после проникновения вируса и, возможно, также после начальных стадий синтеза репликативных интермедиатов (P. Tattersall, личное сообщение). Таким образом, фактор, оп-



ределяющий специфичность к хозяину, требуется, по-видимому, на более поздних стадиях репликации и для последующей экспрессии генов. Интересно отметить, что другой штамм MVM, MVM(i), размножается в лимфоцитах [12, 75], а не в фибробластах. Различие в специфичности к клеткам-хозяевам поддерживается *in vivo*, а также при последовательных пассажах и при пассировании методом конечного разведения. Это означает, что причина клеточной специфичности заключена в вирусном геноме. Данное предположение подтвердил рестрикционный анализ, который показал, что у этих двух штаммов MVM различаются 20% сайтов рестрикции [82]. Таким образом, среди вирусных генов есть такие, которые при заражении автономными парвовирусами определяют специфичность к хозяину.

Различные виды AAV также выделяются из разных хозяев. Однако опыт работы в лабораториях показал, что при совместном заражении с аденовирусом AAV способен расти в любых клетках, если в них размножается аденовирус. Так, AAV человека реплицируется в клетках собаки при совместном заражении с аденовирусом собак [23]. Аналогичным образом AAV-1, впервые выделенный из тканей человека, по-видимому, раньше был обезьяньим вирусом (M. D. Hoggan, неопубликованные данные).

Репликация ДНК и сборка парвовирусов происходят в клеточном ядре. Локализация процесса репликации и относительная простота генома парвовирусов позволяют предположить, что значительную часть аппарата, необходимого для репликации, обеспечивает клетка-хозяин. В случае автономных парвовирусов это представление возникло из того факта, что для синтеза их ДНК необходимо, чтобы зараженная клетка находилась в S-фазе [95, 120, 121]. При размножении AAV по крайней мере часть клеточных функций, необходимых для репликации автономного парвовируса, заменяется функциями вируса-помощника. Репликативный комплекс ДНК AAV, выделенный из клеток при совместном заражении с вирусом простого герпеса, содержит ДНК-полимеразу вируса герпеса [42]. Недавнее открытие аденовирусной ДНК-полимеразы [112] дает основание предполагать, что этот фермент также может участвовать в репликации ДНК AAV, если в качестве вируса-помощника используется аденовирус. Однако в настоящее время генетические данные не подтверждают это предположение (см. ниже).

Поскольку в репликации ДНК парвовирусов огромную роль играют клеточные функции и (или) функции вируса-помощника, до недавнего времени было непонятно, есть ли у этих вирусов ранние функции, т. е. происходит ли синтез вирусных РНК и белков до того, как начнется репликация ДНК. В первых работах методом гибридизации на фильтрах было показано, что



синтез РНК всегда идет параллельно с синтезом ДНК [102]. Однако с появлением методики носерн-блотинга удалось обнаружить синтез вирус-специфической РНК и в отсутствие репликации ДНК [90]. Синтезируемые РНК, по-видимому, аналогичны тем, которые появляются после начала репликации ДНК, хотя, возможно, есть различия в относительном количестве разных фракций. Как обсуждается ниже, у автономных парвовирусов обнаружен белок, ковалентно связанный с 5'-концами некоторых репликативных форм ДНК; этот белок является кандидатом на роль раннего белка [94]. Экстракты клеток, зараженных AAV, помимо капсидных белков содержат еще некоторые вирусные белки [15]. Таким образом, идентификация и определение свойств ранних белков остаются одним из основных вопросов, которые предстоит решить в связи с репликацией парвовирусов.

## Репликация ДНК

У парвовирусов репликация ДНК происходит в ядре. В случае автономных парвовирусов она протекает в тесной связи с клеточным хроматином; это согласуется с представлением о том, что данный вирусный процесс сильно зависит от клеточных функций [75]. Из зараженных клеток были выделены репликативные комплексы AAV и автономных парвовирусов, что позволило выявить некоторые стадии нормального синтеза вирусной ДНК (см. ниже).

Большая часть имеющейся информации относительно молекулярного механизма репликации ДНК парвовирусов получена в результате детального анализа структуры зрелой вирионной ДНК и выделенных из зараженных клеток различных репликативных интермедиатов. Модели репликации ДНК AAV и автономных парвовирусов представлены на рис. 27.3. Рассмотрим сначала модель репликации ДНК AAV, поскольку она несколько проще и разработана более детально. Главной отличительной чертой этой модели является то, что при инициации синтеза ДНК ее 3'-концевая последовательность сворачивается в шпильчатую структуру, которая начинает играть роль затравки. Существование такой стадии подтверждается рядом данных: а) последовательность на 3'-конце является аутокомплементарной [78]; б) шпильчатые структуры могут самопроизвольно образовываться *in vitro* (W. W. Hauswirth, K. I. Berns, неопубликованные данные); в) из зараженных клеток выделены репликативные интермедиаты со шпильчатой структурой [48, 115]; г) репликация ДНК AAV *in vivo* начинается с 5'-конца (или вблизи его) дочерней цепи и заканчивается на 3'-концах дочерних цепей [46, 47].

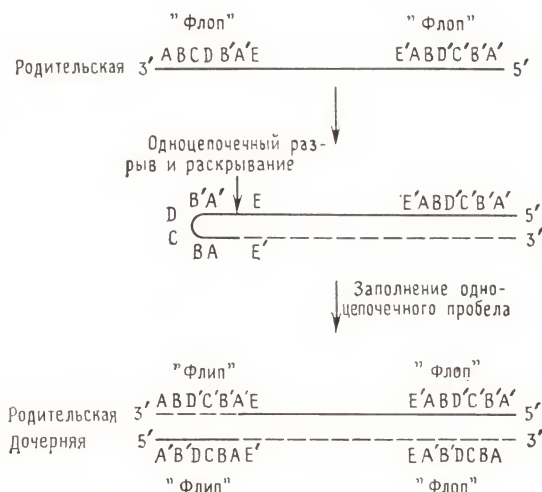


Рис. 27.3. Модель репликации ДНК AAV.

Вначале интермедиат представляет собой линейную двухцепочечную молекулу, цепи которой ковалентно соединены в шпильке на одном из концов. Ковалентное соединение должно устраняться таким образом, чтобы в результате дочерняя цепь содержала интактную 5'-концевую последовательность, а родительская — правильную последовательность на 3'-конце. Согласно модели, необходимое расщепление происходит в точке родительской цепи, расположенной напротив первоначального 3'-концевого основания. Эта точка находится рядом со 125-м основанием исходной молекулы. Таким образом, первые 125 оснований переносятся с родительской цепи на дочернюю, и при этом родительская цепь укорачивается с 3'-конца на 125 оснований. В модели предполагается, что 3'-ОН может служить затем в качестве затравки в процессе типа репарации. В результате заполняется одноцепочечный участок, причем перенесенный фрагмент длиной 125 нуклеотидов служит в качестве матрицы. Эта стадия является для модели наиболее критической, здесь делаются конкретные предположения, которые можно проверить. Такой перенос шпильчатой последовательности должен приводить к инверсии. Исходное 125-е основание на 3'-конце родительской цепи становится после переноса 1-м основанием 5'-конца дочерней цепи. Как уже отмечалось выше, структура последовательности 125 концевых оснований такова, что инверсия должна приводить к появлению у AAV концевых последовательностей двух типов, которые различаются на участке между основаниями 42 и 84 (два небольших внутренних палиндрома).

И действительно, найдены именно эти два типа последовательностей, причем их структура отвечает инверсии 125 концевых оснований [78]. Модель также предсказывает, что обе последовательности встречаются в вирионной ДНК с одинаковой частотой на любом конце. Это было подтверждено экспериментально [78]. Согласно модели, ориентация последовательности на одном конце не должна зависеть от ориентации последовательности на другом. Справедливость этого предсказания также доказана в эксперименте [77].

Совсем недавно интактный геном AAV клонирован в бактериальной плазмиде pBR322 [107]. Когда эта рекомбинантная плазида в результате трансфекции была внесена в культуру клеток человека, зараженных аденовирусом-помощником, ДНК AAV была «спасена» и стала реплицироваться; при этом синтезировались инфекционные вирионы. Такая система предоставляет возможность еще более строгой проверки модели, показанной на рис. 27.3. В плазмиде может быть только одна ориентация 125 концевых оснований на любом конце последовательности ДНК AAV. В использованном клоне на обоих концах вставки была одинаковая ориентация. Однако в ДНК, выделенной из дочерних вирионов, которые были получены после трансфекции, с одинаковой вероятностью были обнаружены обе ориентации на обоих концах; это показывает, что во время литического цикла AAV происходит инверсия.

Использованная система позволила ответить и на другие вопросы, касающиеся репликации ДНК AAV. Основные выводы, которые были сделаны, заключаются в следующем: а) концевые инвертированные повторы и симметрия 125 концевых оснований служат эффективным механизмом сохранения концевых последовательностей; б) изменение структуры, показанной на рис. 27.1, должно приводить к отрицательным последствиям для репликации ДНК [108]. Как обсуждалось выше, у 15% молекул на 5'-концах вирионной ДНК AAV отсутствуют два концевых Т. На обоих 5'-концах вставки ДНК AAV в использованном клоне не было обоих Т, однако после трансфекции подавляющее большинство дочерних вирионов содержали Т на 5'-концах ДНК. Эти результаты показывают, что расщепление шпильки действительно происходит главным образом между 124-м и 125-м основаниями, хотя возможно и смещение на одно основание в обе стороны. Еще более существенная коррекция наблюдалась в одном из клонов, в котором было deletировано 113 оснований на одном из концов и 9 оснований на другом. Этот клон также был «спасен», при этом дочерние вирионы содержали интактную ДНК с восстановленной исходной последовательностью. Здесь возможно лишь одно объяснение: 3'-конец, в котором отсутствовали 9 оснований, все еще был способен формировать шпильку



и служить затравкой при синтезе ДНК, в результате которого и была восстановлена делетированная последовательность (рис. 27.3). Другой конец, имеющий делецию длиной 113 оснований, не мог больше образовывать шпильку, но оставшийся концевой инвертированный повтор (32 основания) мог оказаться достаточным, чтобы ДНК образовала одноцепочечное кольцо, удерживающееся концевым двухцепочечным участком. Если в более короткой цепи этого участка был свободный 3'-ОН, то он мог служить затравкой в синтезе ДНК по типу репарации, в результате чего происходили бы заполнение пробела и последующая репликация ДНК на восстановленной структуре. (Подобные кольцевые структуры, возможно, являются нормальными интермедиатами при первом акте репликации ДНК. Эта гипотеза очень привлекательна, поскольку в данном случае 3'-концевая шпилька могла бы образовываться из двухцепочечной структуры, что предполагается на последующих стадиях репликации.)

Главная проблема, связанная с репликацией и поддержанием линейных геномов, заключается в сохранении концевых последовательностей. В ДНК AAV благодаря присутствию инвертированного концевого повтора и из-за палиндромной структуры последовательности концевых 125 оснований по существу имеются четыре копии многих важных последовательностей. Следовательно, ДНК AAV из описанного выше клона, утратившая по девять оснований на обоих концах, все равно была жизнеспособной, поскольку оставшиеся две копии этой последовательности на внутренних участках позволяли восстановить делетированные последовательности на обоих концах. Значение сохранения в интактном виде концевой последовательности показано при введении дополнительной 11-парной делеции в клонированную ДНК AAV, о которой говорилось выше. Дополнительная делеция затронула верхушку одного из плеч Т-образной структуры и включила в себя симметричную последовательность, которая на другом конце молекулы уже была утрачена. Таким образом, в результате эта короткая последовательность была полностью утрачена. И хотя ДНК из этого клона можно было «спасти» из плазмиды после трансфекции, репликация ДНК была сильно подавлена и образования дочерних вирионов не происходило [108].

Репликация ДНК автономных парвовирусов в целом похожа на репликацию ДНК AAV, однако имеются и значительные различия, отражающие различия в строении геномов. Для ДНК автономных парвовирусов характерно отсутствие каких-либо концевых повторов и наличие инверсии на 5', но не на 3'-конце [1, 3, 98, 105]. Различия в зрелых вирионных ДНК отражаются в различиях, обнаруженных в структуре репликативных интер-



медиатов. Оказалось, что, подобно интермедиатам AAV, интермедиаты автономных парвовирусов имеют ковалентно замкнутую концевую шпильчатую структуру [46, 49, 74, 110, 121]. Однако один из типов репликативных интермедиатов имеет на 5'-конце ковалентно связанный белок (мол. масса 50K). (Неизвестно, связан ли этот белок с одним или с обоими 5'-концами и есть ли на одном из концов шпильчатая структура [3, 94].) Вместе с тем при репликации ДНК AAV в таких же условиях ковалентно связанный белок обнаружить не удалось (D. C. Ward, неопубликованные данные). Кроме того, 5'-концевая последовательность, с которой ковалентно связан белок, содержит 18 дополнительных нуклеотидов, не входящих в состав вирионной ДНК [3]. На основании этих данных была предложена видоизмененная модель репликации ДНК автономных парвовирусов [3], согласно которой на димерном репликативном интермедиате при непосредственном участии концевого белка происходит рекомбинационный процесс, в результате чего сохраняется уникальная последовательность на 3'-конце вирионной ДНК (рис. 27.4). Характерной особенностью этой модели являются наличие в качестве обязательной промежуточной формы линейной димерной двухцепочечной молекулы и участие в процессе 5'-концевого белка.

Изучена способность к репликации (при трансфекции ДНК клеток мышей) нескольких геномов MVM с делециями, полученных *in vitro* путем клонирования концевых фрагментов в бактериальной плазмиде pBR322 (D. C. Ward, личное сообщение). Обнаружено, что так же, как и у AAV, для репликации в одной молекуле ДНК должны присутствовать обе концевые палиндромные последовательности. Полученные *in vitro* делеции внутри 200-парного концевого участка приводят к подавлению способности к репликации, в то время как внутренние делеции даже значительной длины не влияют на способность к репликации, если заражение проводить совместно с интактным вирусом-помощником.

Структурные исследования дали достаточно детальную картину механизма репликации ДНК парвовирусов; вместе с тем изучение биохимии этого процесса в настоящее время находится в зачаточной стадии. Ни для одного из родов не известно окончательно, какая ДНК-полимераза требуется для этого процесса. В случае автономных парвовирусов описана система, в которой синтез ДНК инициируется экзогенной вирионной ДНК, играющей здесь роль матрицы-затравки [65]. При фракционировании этой системы удалось выделить ферментативную активность, которая больше всего похожа на клеточную ДНК-полимеразу  $\gamma$ . В отношении способности инициировать синтез ДНК в присутствии экзогенной вирионной ДНК между незараженными и за-

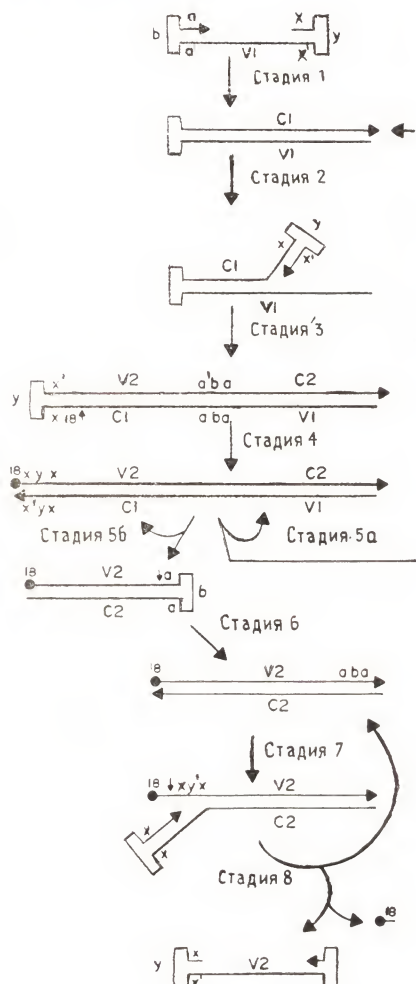


Рис. 27.4. Модель репликации ДНК автономных парвовирусов.  $aba'$  — 3'-концевой палиндром в последовательности ДНК вируса ( $V1$ );  $xuh'$  — 5'-концевой палиндром. Стрелками на цепях ДНК отмечены 3'-концы. Черным кружком показано место, где, по-видимому, находится ковалентно связанный 5'-концевой белок. Первая стадия заключается в превращении инфицирующей родительской ДНК (цепь  $V1$ ) в мономерную двухцепочечную репликативную форму (РФ) путем синтеза комплементарной цепи ( $C1$ ), начинающейся на 3'-ОН-конце шпильки вирусной цепи (стадия 1). Следующая стадия состоит в репликации мономерной двухцепочечной РФ за счет удлинения новой комплементарной цепи на 3'-ОН-конце (стадия 2). При этом синтез инициируется образованием шпильчатой структуры на 3'-конце вирусной РФ. Поскольку репликативными интермедиатами являются димерные РФ, следующая стадия — это их образование в ходе синтеза ДНК, начинающегося на 3'-конце  $C1$  и продолжающегося до естественного конца матрицы (стадия 3).

В результате репликации синтезируются популяция вирусных ДНК-цепей, имеющих одинаково ориентированные последовательности на 3'-конце и одну из взаимно инвертированных последовательностей на 5'-конце. Можно представить себе прямой путь, с помощью которого эти цепи образуются из одного основного интермедиата — мономерной двухцепочечной РФ, содержащей вирусную структуру (у которой 3'-концевая последовательность такая же, как у родительской цепи) и комплементарную цепь, связанную с первой шпильчатой структурой, образован-

ной вирусной 5'-концевой последовательностью. Мономерная РФ образуется непосредственно из димерной РФ при внесении одноцепочечного разрыва в  $C1$  на 5'-конце палиндрома и последующей достройки шпильки  $V2-C1$ , как показано на рисунке. Если в месте разрыва образуется 3'-ОН, то при репликации здесь вновь удлиняется вирусный 5'-конец согласно схеме Кавалье — Смита (стадия 4). Чтобы объяснить появление лишних 18 нуклеотидов, обнаруженных на 5'-конце вирусной цепи в молекулах РФ, разрыв должен происходить на расстоянии 18 нуклеотидов от 5'-конца  $V2$ , как показано на рисунке (стадия 4). Возможно, что эти лишние 18 нуклеотидов необходимы для прикрепления на 5'-конце концевой белка. Если это так, то димерная РФ, по-видимому, первая молекула, с которой может связываться 5'-концевой белок, причем она должна содержать только одну белковую молекулу на 5'-конце  $V2$ .

Теперь димерная РФ содержит две комплементарные цепи, и 3'-концы любой из них могут образовать шпильки для инициации синтеза ДНК точно.

раженными клетками не обнаружено никаких различий. Ингибиторы клеточной ДНК-полимеразы подавляют синтез вирусной ДНК, тогда как ингибиторы других ДНК-полимераз на образование вирусной ДНК не влияют [93]. Коллек и др. [66, 67] описали систему *in vitro*, в которой используют интактные ядра из клеток, зараженных вирусом Н1. Вирус-специфический синтез ДНК в ней подавлялся как афидиколином — ингибитором полимеразы  $\alpha$ , так и 2', 3'-дидезокситимидин-5'-трифосфатом (ddTTP) — ингибитором эукариотических ДНК-полимераз (порядок подавления полимераз:  $\gamma > \beta > \alpha$ ). Таким образом, в этом процессе, по-видимому, участвуют и полимеразы  $\alpha$ , и полимеразы  $\gamma$ , чувствительная к ddTTP (вероятнее всего, полимеразы  $\gamma$ ). В данном случае [67] анализ продуктов показал, что инициация синтеза вирусной ДНК происходила *in vitro*. Кинетические данные согласуются с предположением о том, что полимеразы  $\alpha$  участвуют в синтезе, приводящем к вытеснению цепи в молекулах репликативной формы (РФ), а полимеразы  $\gamma$  превращают вытесненные цепи (и, возможно, также инфицирующую вирусную ДНК) опять в двухцепочечную РФ. Таким образом, весьма вероятно, что *in vivo* в дополнение к некоторым неструктурным белкам, закодированным в вирусном геноме, необходима и клеточная ДНК-полимераза (или полимеразы).

Биохимия репликации ДНК ААV изучена, пожалуй, еще меньше. Самые последние данные получены в результате изучения репликативных комплексов, которые выделяли из клеток, зараженных ААВ совместно с вирусом-помощником — аденовирусом или вирусом простого герпеса [42]. В обоих случаях эти комплексы могли осуществлять только элонгацию, но не инициацию. В последнем случае с комплексом была связана ДНК-

---

так же, как на стадии 2. При элонгации С2 (стадия 5а) синтезируется мономерная РФ (с инвертированной 3'-концевой последовательностью в С2 в соответствии со схемой Кавалье — Смита); при этом вытесняется мономерная РФ, идентичная исходной. Элонгация С1 (стадия 5б) также приводит к образованию димерной РФ, но теперь в результате смещения образуется основная мономерная РФ, например (V2)3',5' (С2). Если 5'-концевой белок участвует в образовании шпильки, в результате чего начинается смещающий синтез, и если этот белок находится на 5'-конце V2, так как именно здесь расположены лишние 18 нуклеотидов, то возможно, что смещающий синтез на димерной РФ будет асимметричным с элонгацией только С1 (стадия 5б). Благодаря этому может исключаться менее продуктивная элонгация С2 (стадия 5а).

Как только образуется основной интермеднат, образование вирусных цепей происходит без затруднений. Дистраивание вирусной 3'-шпильки (как показано на стадии 6) и повторяющийся цикл синтеза с использованием в качестве матрицы С2 (стадия 7 и 8) приводят к образованию вирусных цепей, которые имеют такой же 3'-конец, как у родительской цепи (aba'), и содержат одну из двух взаимно инвертированных 5'-концевых последовательностей (хух' или ху'х').



полимераза вируса простого герпеса, тогда как в первом связанная ДНК-полимераза более всего походила на клеточную полимеразу  $\alpha$ .

В заключение следует отметить, что постепенно вырисовывается достаточно полная картина структуры интермедиатов, участвующих в репликации ДНК парвовирусов. Хотя биохимия этой системы изучена в меньшей степени, относительная простота вирусного генома и сильная зависимость (по крайней мере автономных парвовирусов) от клеточных функций должны способствовать появлению в ближайшем будущем интересных работ в этой области.

### Синтез РНК

Так же как и в случае репликации ДНК, модели синтеза РНК для обоих вирусов в целом похожи, хотя и имеют различия в деталях. Хотя фракции мРНК, которые, по-видимому, кодируют неструктурные белки, обнаружены, пока неизвестны ни их функции, ни механизм регуляции их экспрессии. У вирусов обоих родов найдены РНК трех типов. Среди автономных парвовирусов они картированы наиболее точно у MVM и H1 [3, 92, 99]. У MVM (рис. 27.2) самая большая РНК имеет почти полную длину генома, простираясь между 0,04 и 0,95 ед. карты с коротким интроном, локализованным между 0,46 и 0,48 ед. карты [92]. Вторая мРНК также простирается от 0,04 до 0,95 ед. карты, но содержит два интрона, причем больший из них расположен между 0,10 и 0,40 ед. карты, а интрон меньшего размера также находится в окрестности 0,47 ед. карты [92]. Третья РНК начинается в точке 0,46 ед. карты и доходит до 0,95 ед. карты [92]. Эта РНК содержит тот же интрон меньшего размера, что и вторая РНК, но ее 5'-конец не доходит до большого интрона, который найден в РНК второго типа. Перед обоими 5'-концами (0,04 и 0,40 ед. карты) приблизительно на 30 нуклеотидов выше находится ТАТА-последовательность [3, 92]; у РНК всех типов имеются метилированные кэпы. Так же как и у транскриптов AAV, у MVM молекулы всех трех основных типов РНК, по-видимому, имеют один и тот же сайт полиаденилирования. Очень похожая схема транскрипции обнаружена и у вируса H1 (рис. 27.2) [99].

Изучены три транскрипта AAV [3, 40, 72], найденные в двух формах — до сплайсинга и после него (рис. 27.2). Они имеют разные 5'-концы, однако 3'-конец в точке 0,96 ед. карты (4420-е основание) у них общий. Самый большой транскрипт начинается в точке 0,06 ед. карты (1853-е основание) [40, 76]. Выше каждого транскрипта на расстоянии  $31 \pm 1$  основание находится ТАТА-последовательность, а на 22 основания выше начала



участка *poly* (A) находится предполагаемая сигнальная последовательность полиаденилирования (AATAAA). Все три транскрипта имеют общий интрон, расположенный между 0,40 и 0,46 ед. карты (между основаниями 1907 и 2227) [39, 72, 76]. В цитоплазме их обнаружили лишь в форме, которая возникает после сплайсинга, причем из них только самый короткий транскрипт, который составляет подавляющее большинство AAV-специфических цитоплазматических РНК, найден в составе полисом. Все транскрипты полиаденилированы и имеют кэпы [18].

Для парвовирусов всех родов нет четких данных о том, имеется ли общий предшественник, который в результате последующего процессинга превращается в РНК разных типов, или же ТАТА-последовательности, лежащие выше каждого из 5'-концов, служат в качестве индивидуальных промоторов. Последняя возможность более вероятно, поскольку опыты *in vitro* показали, что у MVM и AAV внутренние ТАТА-последовательности распознаются правильным образом [38, 92].

Физиологическая роль РНК всех этих типов пока не ясна. В недавних работах по секвенированию ДНК [3] и в опытах по трансляции *in vitro* (S. Cotmore, P. Tattersall, неопубликованные данные) обнаружено, что самая короткая из РНК MVM (3 kb) кодирует VP-2 и VP-3. Таттерсол и др. [117] показали, что белок V-3 скорее всего представляет собой продукт расщепления VP-2. мРНК длиной 3,3 kb, по-видимому, кодирует VP-1 ([3], S. Cotmore, P. Tattersall, неопубликованные данные). Наконец, трансляция *in vitro* (Cotmore, Tattersall, неопубликованные данные), свидетельствует о том, что самая большая РНК может кодировать два неструктурных белка с мол. массами 85K и 25K. Согласно данным по трансляции *in vitro*, самый короткий транскрипт AAV кодирует все три структурных белка AAV [55]. Более протяженные РНК пока не удалось выделить в количествах, достаточных для изучения трансляции *in vitro* и последующего определения свойств полипептидных продуктов.

Регуляция синтеза РНК AAV зависит не только от факторов клетки-хозяина, например полимеразы, но также и от функций генов вируса-помощника [102]. Если клетки заражены только AAV, вирусная РНК не синтезируется. Однако клетки, трансформированные аденовирусом, в которых экспрессируются только ранние аденовирусные гены E1A и E1B, поддерживают синтез РНК AAV при заражении только AAV [90]. Этот экспериментальный факт отчетливо демонстрирует тесную связь между AAV и аденовирусом, так как эти гены, в особенности E1A, участвуют в регуляции ранней транскрипции аденовирусов [7, 61].

В связи с этим возникает еще один интересный вопрос: что служит матрицей для транскрипции AAV, которая наблюдается при заражении клеток, трансформированных аденовирусом?

В отсутствие вируса-помощника синтез ДНК обычно не идет. Исследования с использованием наиболее чувствительных из всех известных в настоящее время методов дали противоречивые результаты. В одной работе синтез зарегистрировать не удалось [30], тогда как в другой было показано, что, возможно, на некоторых внесенных вирусных ДНК синтезируется комплементарная цепь (R. Bohenzky, K. Berns, неопубликованные данные). Вместе с тем ни в одной из этих работ не было однозначно показано настоящего синтеза ДНК. Те гены в трансформированных аденовирусом клетках (H14b) [90], которые активируют транскрипцию генома AAV, не способны поддерживать нормальную репликацию ДНК AAV. Таким образом, если синтеза ДНК AAV нет, то транскрипция должна происходить с одноцепочечной ДНК, а такой процесс в молекулярной биологии эукариот пока неизвестен.

### Синтез белков

Синтез белков относится к наименее изученным аспектам макромолекулярного метаболизма парвовирусов. В случае AAV-2 только для белков капсида получены доказательства, что они кодируются вирусным геномом, но даже здесь картина не достаточно ясна. Все три белка, по-видимому, кодируются большой открытой рамкой в правой половине генома [3, 55, 99, 111]. Хотя эта последовательность есть во всех трех зрелых транскриптах, только самая короткая мРНК при трансляции *in vitro* дает иммунологически узнаваемый структурный белок (т. е. белок, который осаждается антителами к белкам капсида); при этом в системе *in vitro* синтезируются все три белка капсида [55]. Непонятно, как это происходит. В ретикулоцитной системе, использовавшейся в этих опытах, неизвестны ферменты, которые могли бы осуществлять процессинг первичного полипептида, а открытая рамка только одна [39, 111]. Возможно, что один или два стоп-сигнала иногда могут быть случайно пропущены, однако первая последовательность AUG встречается лишь на 2810-м основании, а расстояния до 3'-конца этой мРНК недостаточно для белка такого размера, как у VP-1 AAV. Вместе с тем этого было бы достаточно для белка VP-2, если бы происходил пропуск стоп-сигнала или сдвиг открытой рамки, так что основная проблема связана с VP-1 из-за его предполагаемого размера. Вероятнее всего, VP-1 кодируется минорным транскриптом с дополнительным интроном, который из-за его малой концентрации до сих пор не обнаружен. Совершенно иная ситуация имеет место у автономных парвовирусов. В этом случае относительное количество белков VP-2 зависит от времени после заражения культуры клеток [117], причем с увеличением времени наблюдается уменьшение относительного количества VP-2.

Такой же результат получен после обработки трипсином вирионов, образующихся вскоре после заражения [117]. Это означает, что по крайней мере у автономных парвовирусов белок VP-3 является продуктом расщепления VP-2. Ситуация осложнилась после сообщения о том, что Lu III, образующийся в некоторых культурах клеток, содержит лишь VP-3 (G. Siegel, неопубликованные данные). Ни одна из предложенных выше гипотез не в состоянии объяснить обнаружение ряда подфракций VP-1 и VP-3 AAV [83]. Решающим шагом в разрешении проблем, связанных с капсидными белками, могло быть их секвенирование. К сожалению, попытки осуществить это секвенирование оказались безрезультатными.

Ни один из неструктурных белков не идентифицирован окончательно. Открытые рамки в левой половине геномов как автономных парвовирусов, так и AAV могут кодировать белки с мол. массой до 85К. Есть данные относительно существования неструктурного белка приблизительно такого размера в условиях, когда подавлен синтез структурных белков AAV (например, при заражении клеток обезьян аденовирусом человека, который является частичным вирусом-помощником) (R. A. McPherson, J. A. Rose, личное сообщение). Кроме того, при изучении продуктивного заражения клеток вирусом AAV обнаружены дополнительные полипептиды с мол. массами 25К и 16К [14]. Известно, являются ли они неструктурными белками или же продуктами процессинга гипотетического предшественника белков капсида. Белок большего размера, обнаруженный в клетках обезьян (см. выше), должен маскироваться белком VP-2. Белки, похожие на два неструктурных белка меньшего размера, обнаружены в опытах по трансляции *in vitro* мРНК AAV [14]. Было также доказано, что по крайней мере один, а возможно, и два неструктурных белка с мол. массами 85К и 25К кодируются в левой половине генома MVM (S. Cotmore, P. Tattersall, неопубликованные данные).

Можно предположить, что основная функция ранних неструктурных белков состоит в участии в репликации ДНК и ее транскрипции; особенно важно их участие в первом процессе. Естественным кандидатом на роль такого белка является 5'-концевой белок, найденный у автономных парвовирусов. Подобная или аналогичная функция при репликации ДНК AAV могла бы выполняться белком, способным расщеплять концевую шпильку и(или) «расплавлять» двухцепочечные концы репликативных интермедиатов таким образом, чтобы могла образоваться шпилечная затравка. Другая функция могла бы заключаться в регуляции относительного количества различных транскриптов, хотя в случае AAV можно предположить, что ее осуществляет вирус-помощник.



## Дефектные интерферирующие частицы

При росте в культуре клеток парвовирусы обоих родов образуют много дефектных интерферирующих частиц (ДИ-частиц) [19, 26, 29, 30, 33, 48, 50, 59, 73, 85, 96, 97, 118]. ДИ-частицы легко выявляются в препаратах вирусов, поскольку они дают в градиенте CsCl полосу меньшей плавучей плотности вследствие делеций различных участков генома. Геномы ДИ-частиц отличаются от нормального генома по размеру и по структуре. И одноцепочечные, и двухцепочечные структуры встречаются приблизительно с одинаковой частотой. Все одноцепочечные формы имеют внутренние делеции, однако обе палиндромные концевые последовательности сохраняются. Двухцепочечные формы ковалентно «сшиты» на одном конце, причем каждая молекула содержит последовательности только с одного конца генома. В ДИ-частицах AAV оба конца генома представлены с приблизительно одинаковой частотой, тогда как внутренние последовательности при пассажах все более делетируются. Теоретически «сшивка» на концах двухцепочечных ДНК ДИ-частиц может быть либо на нативном конце, либо на необычном концевом участке, который содержит внутренние последовательности генома. Показано, что у MVM перегиб шпильки ДНК ДИ-частиц включает внутренние последовательности [33], тогда как для AAV характерны оба случая. У внутриклеточной двухцепочечной ДНК ДИ-частиц перегиб шпильки образован внутренними последовательностями [48], а у аналогичной ДНК, выделенной из вирионов, он, по-видимому, содержит концевые последовательности [73]. Одно из возможных объяснений заключается в том, что форма ДНК с концевыми последовательностями в перегибе шпильки с большей вероятностью включается в состав вирионов.

Очевидно, ДНК ДИ-частиц первоначально образуются в результате ошибок при репликации ДНК. В случае ДИ-частиц AAV обе формы ДНК — и одноцепочечные молекулы с внутренними делециями, и двухцепочечные формы со шпилькой в тех последовательностях, которые у обычных вирусов являются внутренними, — могли бы легко образовываться при смене цепи, копирующейся в ходе репликации. Еще одна форма двухцепочечной ДНК ДИ-частиц AAV могла бы синтезироваться при копировании матричной цепи, в которую внесен внутренний одноцепочечный разрыв.

Реплицируются ли различные формы ДНК ДИ-частиц — это довольно сложный вопрос. Без вируса-помощника дикого типа они не способны к репликации. Автономный парвовирус Н1 образует дефектную ДНК со специфической делецией и перестройкой в окрестности 0,90 ед. карты генома [97]. Такие ДИ-частицы



реплицируют свою ДНК при совместном заражении с вирусом Н1 дикого типа. Способность генома дикого типа служить помощником является сильным аргументом *prima facie* в пользу того, что для репликации ДНК необходима транс-действующая функция. Однако в случае AAV репликация, даже в присутствии вируса-помощника, не так очевидна. ДИ-частицы подавляют репликацию ДНК дикого типа при совместном заражении, но они теряют эту способность после УФ-облучения [19]. Кроме того, ДИ-частицы AAV не ингибируют репликацию ДНК аденовирусов в отсутствие интактных вирусов AAV.

Репликация ДНК AAV вызывает подавление репликации аденовирусной ДНК, причем этот эффект зависит от дозы вируса. Кинетика этого процесса показывает, что существует конкуренция за фактор, который в начале аденовирусной инфекции содержится в ограниченном количестве. Тот факт, что ДИ-частицы не ингибируют репликацию аденовирусной ДНК в отсутствие вирусов AAV дикого типа, может означать следующее: для того чтобы стать ингибирующим фактором синтеза ДНК, ДИ-частица должна реплицироваться, а для такой репликации необходим транс-действующий продукт AAV дикого типа. Однако в опытах с использованием импульсной метки не удалось надежно зарегистрировать репликацию ДНК ДИ-частиц [48].

ДНК ДИ-частиц обладает еще одним интересным свойством. Если новорожденных сирийских хомячков заразить одновременно аденовирусом и AAV, то способность аденовирусов к индукции опухолей в значительной степени ослабляется [31]. Этот же эффект получают и при замене интактных AAV на ДИ-частицы, т. е. для такого ингибирования репликация AAV не нужна. Таким образом, хотя ДИ-частицы являются безусловно дефектными, они обладают определенным спектром биологических активностей.

### Латентная инфекция AAV

Вирионы AAV способны проникать в ядро клетки, где происходит разделение ДНК, и в отсутствие вируса-помощника [102], однако при этом синтеза вирус-специфических макромолекул не происходит. Проблема состоит в том, как AAV может поддерживать биологическую непрерывность своего генома, если учесть, что при заражении ему не всегда сопутствует вирус-помощник. В значительной степени эта проблема решается благодаря способности AAV интегрировать свою ДНК с клеточным геномом в такой форме, что она без труда «спасается» при последующем заражении клетки вирусом-помощником [52]. Спо-

способность AAV к латентной инфекции, по-видимому, должна быть неотъемлемой частью его жизненного цикла. Интегрировать свой геном с клеточным может не только AAV, но и другие известные ДНК-содержащие ядерные вирусы. AAV отличается от других вирусов тем, что интеграция его генома не приводит к трансформации клетки или временному изменению ее фенотипа, а также тем, что латентный вирусный геном легко «спасается» при последующем дополнительном заражении вирусом-помощником.

Латентную инфекцию AAV впервые обнаружили Хогген и др. [52] при скрининге первичных клеточных культур, предназначенных для производства вакцин. Во всех партиях почечных клеток африканской зеленой мартышки антигены AAV и инфекционный AAV отсутствовали. Однако более 20% партий этих клеток стали продуцировать AAV после заражения клеток аденовирусом (свободным от AAV). Что касается человека, то было показано, что антигены AAV присутствуют в 1—2% партий почечных клеток плода человека. Таким образом, латентная инфекция AAV—довольно распространенное явление.

Для изучения механизмов латентной инфекции ее получали в перевиваемой линии клеток человека (клетки Детройт 6) [11] простым заражением AAV при относительно высокой множественности заражения (250 ТКИД<sub>50</sub> на клетку). В течение более 100 пассажей клетки оставались индуцибельными, т. е. они продуцировали AAV после их заражения аденовирусом, хотя до заражения аденовирусом они были свободны от антигенов AAV и инфекционных вирусов. После 40-го пассажа клетки клонировали, и при этом 30% клонов оставались латентно зараженными. Два положительных клона анализировали методом гибридизации ДНК—ДНК в растворе. Кинетика ренатурации показала, что на диплоидный набор клеточной ДНК приходится от 3 до 5 геномов AAV.

Аналогичным образом Ханда и др. [44] получили культуры латентно зараженных клеток КВ человека. Эти авторы разделяли высоко- и низкомолекулярные ДНК, содержащиеся в клетках, при помощи избирательного солевого осаждения высокомолекулярной (т. е. хромосомной) фракции после денатурации и короткого отжига. Последовательности AAV осаждались совместно с хромосомной ДНК, поэтому был сделан вывод, что геном AAV ковалентно связан с клеточной ДНК.

Более подробно описанные выше клоны Детройт 6 изучены методом блоттинга по Саузерну, когда проводили анализ продуктов расщепления суммарной клеточной ДНК ферментами рестрикции [10, 25]. На основании этих исследований сделаны следующие выводы: а) последовательности AAV ковалентно связаны с клеточной ДНК; б) последовательности AAV инте-

грированы с ДНК каждого клона в очень немногих сайтах, возможно даже в одном сайте; в) последовательности AAV образуют тандемный повтор «голова-к-хвосту»; г) большая часть интегрированных копий находится в интактном состоянии с очень небольшими изменениями; д) участок в месте соединения ДНК AAV и клеточной ДНК всегда включает в себя концевые последовательности зрелой вирионной ДНК, при этом в пределах точности измерений клеточные последовательности неспецифичны (т. е. последовательности AAV в разных клонах связаны с разными клеточными последовательностями). Отмечены также еще два интересных момента. Во-первых, ни один из клонов клеток после восьмого и девятого пассажа (ранние клоны) не содержит свободных ДНК AAV. Однако после 118-го пассажа (поздний клон) в клетках обнаружено некоторое количество свободных вирусных ДНК, хотя большая часть последовательностей AAV все еще находилась в интегрированном состоянии. Таким образом, интегрированные последовательности постепенно переходят в форму, неотличимую от вирионной ДНК. Неизвестно, способны ли реплицироваться такие неинтегрированные формы или же происходит непрерывный медленный переход из интегрированной формы в свободную. Анализ интегрированной ДНК при помощи шести ферментов рестрикции показал, что рестрикционные карты ДНК из клеток раннего и позднего клонов различаются лишь для одного фермента *SmaI*. (Этот фермент разрезает ДНК AAV только в палиндромном участке концевого повтора.) Характер этого различия показывает, что концевые последовательности интегрированной вирусной ДНК обладают специфической генетической функцией при последовательном пассировании клонов.

Многие ядерные ДНК-содержащие вирусы способны вызывать латентную инфекцию *in vivo*, однако подобные инфекции очень трудно исследовать на молекулярном уровне, поскольку всегда остается проблема эквивалентности латентной инфекции в культуре клеток и в природном пермиссивном хозяине. Культуры клеток обычно гибнут при размножении в них ДНК-содержащих вирусов. В отличие от других вирусов AAV благодаря своей полной дефектности не убивает клетки в культуре, а вызывает в них латентную инфекцию. Латентный вирус может быть «спасен» при дополнительном заражении вирусом-помощником. Таким образом, специфические особенности AAV позволяют использовать его в качестве удобной модели для изучения молекулярных механизмов вирусных инфекций.

Исследования трех независимо полученных клонов латентно зараженных клеток Детройт 6 привели к заключению, что для интеграции AAV или его «спасения» не требуется никакой особой клеточной последовательности [10]. Этот вывод подтвер-



жден недавно в работе, в которой ДНК AAV вставляли в рекомбинантную плазмиду pBR322 [107, 108]. Затем ДНК легко «спасалась» в клетках HeLa при совместном заражении плазмидой и аденовирусом. Поскольку в рекомбинантной плазмиде содержится только один геном AAV, по-видимому, tandemные повторы ДНК AAV, обнаруженные в латентно зараженных клетках Детройт 6, не нужны для процесса «спасения». Что действительно необходимо для этого, так это наличие по крайней мере одной концевой палиндромной последовательности либо в интактной форме, либо с делецией, которая, однако, должна быть достаточно малой и находиться в таком месте, чтобы утраченную последовательность можно было восстановить в процессе репликации ДНК. Поскольку до сих пор нет данных относительно того, насколько протяженным должен быть инвертированный концевой повтор на другом конце интегрированной копии (если он вообще нужен) для того чтобы произошло ее «спасение», можно предположить, что его размер должен быть достаточным для спаривания определенного числа оснований, лежащих на разных концах (см. выше). Было проверено несколько клонов с делециями, захватывающими последовательности, выходящие за пределы инвертированного концевого повтора, и ни один из них нельзя было «спасти». Эта система может быть полезной для детального изучения условий, необходимых для «спасения» ДНК AAV в интегрированном состоянии. Что касается автономных парвовирусов, то для них нет никаких данных, свидетельствующих об их интеграции с хозяйской ДНК. Тем не менее недавно получены рекомбинантные плазмиды, содержащие MVM, которые оказались инфекционными при трансфекции ими клеток культуры ткани (M. Merchinsky, P. Tattersall, D. Ward, неопубликованное сообщение). Более того, рекомбинантная плазида, имеющая делецию на 5'-концевом палиндроме, оказалась нежизнеспособной. Можно предположить, что «спасение» двух геномов, MVM и AAV, происходит при помощи одного и того же механизма. Если это так, то «спасение» геномов парвовирусов определяется скорее не специфической последовательностью концевого повтора, а некоторым общим свойством их концевых участков, например наличием палиндромной структуры и(или) тем, что концевые последовательности обоих типов участвуют в процессе инициации репликации ДНК.

### **Взаимодействие между AAV и аденовирусом**

Роль вируса-помощника, необходимого для размножения AAV, способны выполнять и аденовирус, и вирус простого герпеса [4, 5, 16, 51, 91]. Однако AAV в виде примеси чаще встре-

чается в препаратах аденовирусов, и, вероятно, в природных условиях именно аденовирус обычно является вирусом-помощником. По этой причине, а также благодаря тому, что структура аденовируса проще, чем структура вируса простого герпеса, о взаимодействии AAV с аденовирусом известно гораздо больше, чем о взаимодействии AAV с вирусом простого герпеса. Их взаимодействие носит двусторонний характер: аденовирус предоставляет функции вируса-помощника, необходимые для репликации AAV, а возможно, и для его транскрипции и трансляции, тогда как AAV подавляет литическую репликацию и онкогенность аденовируса.

### Функции аденовируса-помощника

Все хелперные функции аденовируса обеспечиваются его ранними генами [20]. Исследование ДНК мутантов *Ad5 ts149* и *Ad5 ts36* [36, 43, 114], которые не синтезируют в заметном количестве продукты поздних аденовирусных генов, показывает, что поздние аденовирусные гены не нужны для литического цикла AAV. Этот вывод подтверждается опытами, в которых аденовирусную ДНК или РНК при помощи трансфекции [53] или микроинъекции [100, 101] вводили в клетки, зараженные AAV.

У аденовирусов известно шесть областей ранней транскрипции: *E1A*, *E1B*, *E2A*, *E2B*, *E3* и *E4*. Изучение необходимых для AAV хелперных функций осложняется тем обстоятельством, что большая часть этих областей кодирует более одного белка [35]. Кроме того, было показано, что по крайней мере два продукта ранних генов влияют на экспрессию других ранних аденовирусных генов. Таким образом, влияние ранних аденовирусных областей может быть как прямым, так и косвенным, опосредуемым другими областями. Наиболее изучен продукт аденовирусного гена *E1A*, необходимый для экспрессии всех других ранних областей аденовируса [7, 61]. Фенотип *E1A*-мутантов, так же как и некоторых *E1B*-мутантов [45, 109], не проявляется при заражении с высокой множественностью. Достаточно подробно изучен также продукт гена *E2A* — ДНК-связывающий белок с мол. массой 72 К. Этот белок, по-видимому, определяет спектр хозяев аденовируса [64], участвует в регуляции других аденовирусных областей [21, 88] и репликации аденовирусной ДНК [32, 119]. Принимая во внимание сложность этих процессов, не приходится удивляться, что данные о взаимодействии аденовируса и AAV до некоторой степени запутаны. В настоящее время полагают, что для выполнения функций вируса-помощника для AAV при некоторых (а возможно, и при всех) условиях требуются аденовирусные области *E1A*, *E1B*, *E2A* и *E4*. Имеются

также данные, свидетельствующие о том, что для этого, возможно, необходим также ген аденовирусной РНК *VA1*.

Опыты по трансфекции ДНК [53, 54] показали, что для синтеза капсидного антигена AAV в клетках 293 требуются области *E2A*, *E4* и *VA1*. Трансформированные аденовирусом клетки 293 конститутивно синтезируют продукты генов *E1A* и *E1B*, следовательно, из опытов с ними ничего нельзя узнать относительно необходимости этих областей.

Результаты опытов с введением фракций ранних мРНК или фрагментов ДНК свидетельствуют о том, что для хелперной активности необходимы области *E1A*, *E2A*, *E4* или мРНК, соответствующая области *E4* [100, 101]. Таким образом, возможно, что *E1A* необходима для «включения» области *E2A*, которая в свою очередь требуется для экспрессии области *E4* [100]. Следовательно, непосредственно для выполнения функций вируса-помощника нужны лишь продукты генов ранней области *E4*. Однако не исключено, что эта схема не дает полной картины. Вполне возможно, что результаты, свидетельствующие о том, что для размножения AAV непосредственно требуются только продукты ранней области *E4*, обусловлены некоторыми специфическими особенностями использованных в этих опытах клеток Vero. Эти обезьяны по происхождению клетки перmissive и для аденовируса человека. Кроме того, при некоторых условиях для синтеза РНК AAV необходимы ранние области *E1A* и (или) *E1B* [89]. Наконец, как обсуждается ниже, есть доказательства того, что продукты гена *E1B* могут участвовать и в репликации AAV [71].

Результаты исследований мутантных аденовирусов в основном согласуются с данными, полученными при использовании трансфекции и микроинъекции. Хотя существуют разные точки зрения о том, является ли *Ad5 ts125* дефектным как вирус-помощник [43, 55, 84, 87, 114], в целом нет сомнений в необходимости продукта гена *E2A* [53, 87, 100]. В отсутствие области *E2A* AAV-специфический синтез макромолекул должным образом не происходит: при этом в основном уменьшается транскрипция или трансляция капсидных генов [54, 55, 87]. В одной из работ показано, что для эффективной транскрипции и трансляции капсидных антигенов необходимы как ген РНК *VA1*, так и область *E2A* [54]. В отсутствие *E2A* не отмечено уменьшения репликации двухцепочечной ДНК AAV [86, 89], но заметно уменьшается содержание ее одноцепочечных форм [86].

Делеции в области *E1B* делают аденовирус дефектным в отношении репликации AAV [71]. Изучение синтеза ДНК показало, что при этом не происходит накопления дочерних одноцепочечных ДНК, а одноцепочечная родительская ДНК распадается [71]. Высказано предположение, что один из продуктов гена



*E1B* модифицирует нуклеазу, индуцируемую аденовирусом [71]. При заражении с высокой множественностью мутантный по *E1B* фенотип проявляется неполностью [109]. Это же справедливо и по отношению к делеционным мутантам *E1B* с дефектными хелперными функциями [71]. В отличие от делеционных мутантов точечные мутанты в области *E1B* Ad5 *hr6* и Ad5 *hr7* оказались нормальными вирусами-помощниками для AAV [53, 89]. Обнаружено, однако, что *hr6* дефектен в отношении «спасения» ДНК AAV в латентно зараженных клетках [89]. Ввиду того что «спасение» ДНК AAV при латентной инфекции может представлять собой необычный тип репликации ДНК AAV [108], было бы неудивительно, если бы *hr6* оказался частично пригодным для репликации вирионной ДНК AAV, но дефектным в отношении «спасения» латентных геномов. Можно предложить и альтернативное объяснение, согласно которому в «спасении» и в репликации генома AAV участвуют разные продукты гена *E1B* [71]. Возможно, имеет значение то, что в отношении репликации аденовирусной ДНК *hr6* и *hr7* имеют фенотип ДНК<sup>+</sup> [70], тогда как мутант *dl313* с делецией в области *E1B* имеет фенотип ДНК<sup>-</sup> [109]. Еще одно свидетельство прямого взаимодействия между геномом AAV и продуктами аденовирусных генов *E1B* (или *E1A*) получено при изучении подавления вирусом AAV онкогенности аденовируса (см. ниже).

Исследование *E1A*-мутантов показывает, что *E1A* играет существенную роль в репликации AAV [53, 89]. Скорее всего, воздействие этого гена косвенное, опосредованное другими ранними аденовирусными областями, хотя возможно также, что *E1A* непосредственно участвует в активации транскрипции AAV [90]. Впрочем, этот вопрос остается открытым.

Наконец, было показано, что делеция в областях *E3* и *E4* у Ad2 *dl807* приводит к значительному ослаблению репликации AAV [17]. Остаточный низкий уровень репликации, обнаруженный с *dl807*, возможно, объясняется побочным эффектом заражения вирусного препарата *dl807* вирусом-помощником дикого типа или же тем, что deletирована не вся область *E4*. Делеция только в области *E3* не влияет на рост AAV или аденовируса [17, 24]. Интересно отметить, что делеция *dl807* не влияет на репликацию аденовирусной ДНК, однако приводит к дефектности в отношении экспрессии поздних аденовирусных генов [24]. Область *E4* кодирует целых восемь полипептидов, причем недавно было показано, что мутация в одном из них — белке 24 K приводит к дефектности в отношении репликации AAV (R. J. Samulski, R. Halbert, T. Shenk, неопубликованные данные). Пока неясно, является ли этот белок единственным из всех закодированных в *E4*, который обладает хелперной активностью.

В заключение следует отметить, что, как было показано,

хелперной активностью обладают шесть аденовирусных областей: *E1A*, *E1B*, *E2A*, *E2B*, *E4* и *VA1*. Область *E2B*, которая, по-видимому, кодирует аденовирусный концевой белок и недавно открытую аденовирусную ДНК-полимеразу [113], не требуется для репликации ДНК AAV. По-видимому, на репликацию ДНК AAV прямое воздействие оказывают только области *E1B* и *E4*.

### Подавление аденовирусной репликации

Аденовирусная литическая инфекция подавляется при совместном заражении с AAV. Самая ранняя стадия процесса репликации, на которой можно заметить эффект ингибирования, — это репликация аденовирусной ДНК. Ингибирование зависит от множественности заражения. При заражении AAV с очень высокой множественностью подавляется и репликация AAV [19]. Таким образом, создается впечатление, что происходит конкуренция за один из продуктов (возможно, за несколько продуктов) аденовирусных ранних генов или же за имеющийся в ограниченном количестве клеточный продукт. Если заражение AAV происходит спустя 6—7 ч после заражения аденовирусом, ингибирования не наблюдается [20]. В это время интенсивно реплицируется аденовирусная ДНК, и, вероятно, продукты аденовирусных генов образуются в значительном количестве. Даже в тех случаях, когда аденовирусная репликация сильно подавлена, непонятно, продуцирует ли большая часть клеток много вирионов AAV и мало аденовирусных или же немногие клетки продуцируют только аденовирусы, а большая часть клеток — только AAV.

Способность AAV подавлять аденовирусную репликацию поднимает вопрос о том, ингибирует ли AAV аденовирусную инфекцию *in vivo*. К сожалению, имеющиеся в настоящее время клинические данные неубедительны. Эффекты ингибирования могут иметь большое значение для некоторых видов, таких, например, как домашние птицы [28].

### Подавление аденовирусной онкогенности

Аденовирус может вызывать саркому у новорожденных сирийских хомячков. Если хомячков заразить аденовирусом совместно с AAV, то образование опухолей задерживается, а их число значительно уменьшается [22, 63, 80]. Для получения такого эффекта заражение AAV должно происходить одновременно с заражением аденовирусом. Если задержать заражение AAV даже на один день, то эффект не наблюдается; предварительное заражение беременной самки также безрезультатно

[80]. Интактные вирионы можно заменить очищенной ДНК AAV [31]. Интересно отметить, что ДНК необязательно должна быть интактной, причем даже не все участки генома должны быть представлены — достаточно только концевых последовательностей.

Образование опухолей у новорожденных сирийских хомячков может быть индуцировано эмбриональными клетками, трансформированными *in vitro* аденовирусом. Заражение этих клеток AAV не только в значительной степени подавляет их онкогенность, но и приводит к ингибированию некоторых свойств, связанных с трансформацией клеток в культуре [90]. А именно, понижается насыщающая плотность клеток в культуре, на 50—90% уменьшается также способность клеток к клонированию на метилцеллюлозе. Эта система дает возможность изучать влияние суперинфекции AAV на молекулярном уровне. Хотя интегрированные аденовирусные последовательности не изменяются и лишь в аденовирус-специфических транскриптах заметны минимальные изменения, наблюдается значительное уменьшение (на 80%) количества обнаруженного опухолевого антигена. Подавление онкогенности происходит не по принципу «все-или-ничего», поскольку *in vivo* его можно компенсировать увеличением в пять раз количества внесенных клеток. Это хорошо согласуется с наблюдаемым 80%-ным уменьшением количества опухолевого антигена. Правдоподобная гипотеза, объясняющая подавление онкогенности, заключается в следующем: при уменьшении количества опухолевого антигена увеличивается период, необходимый для индуцирования опухоли, благодаря чему зараженные животные имеют больше времени для выработки эффективного иммунного ответа. При увеличении внесенной дозы в пять раз время, доступное для выработки иммунного ответа, соответственно уменьшается и число наблюдаемых опухолей возрастает до контрольного уровня.

## Заключение

Парвовирусы являются одними из самых простых ДНК-содержащих вирусов животных. Небольшой геном кодирует только белок капсида и самое большее один или два неструктурных белка. Таким образом, их репликация находится в сильной зависимости от экзогенных функций, предоставляемых либо клеткой-хозяином, либо вирусами-помощниками. Это делает парвовирусы удобным инструментом при изучении клеточных функций, а в случае AAV — и функций некоторых других ДНК-содержащих вирусов. Исследования самих парвовирусов уже достигли такого уровня, что известны полные нуклеотидные последовательности геномов MVM и вируса H1 (автономные пар-



вовирусы) и AAV-2. Продукты транскрипции картированы на нуклеотидном уровне, и выяснена детальная картина репликации ДНК. Меньше изучены структура и синтез белков. Здесь продвижение вперед в значительной степени зависит от определения аминокислотной последовательности белка капсида и от идентификации неструктурных белков. В целом исследования уже достигли биохимического уровня, и можно надеяться, что в ближайшем будущем будут выяснены различные хелперные функции, предоставляемые клеткой и (или) вирусами-помощниками.

### Литература

1. Astel C. R., Smith M. Chow M. B. Ward D. C. (1979). Sequence of the 3'-terminus of the genome from Kilham rat virus, a nondefective parvovirus, *Virology*, **96**, 669.
2. Astel C. R., Smith M., Chow M. B., Ward D. C. (1979). Structure of the 3' hairpin termini of four rodent parvovirus genomes: Nucleotide sequence homology at the origins of DNA replication, *Cell*, **17**, 691.
3. Astel C. R., Thomas H., Chow M. B., Ward D. C. (1982). Structure and replication of minute virus of mouse DNA, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **47**, 751.
4. Atchison R. W., Casto B. C., Hammon W. McD. (1965). Adenovirus-associated defective virus particles, *Science*, **149**, 754.
5. Bachmann P. A., Hoggan M. D., Kurstak E., Melnick J. L., Pereira H. G., Tattersall P., Vago C. (1979). Parvoviridae: Second report, *Intervirology*, **11**, 248.
6. Ben-Asher E., Bratosin S., Aloni Y. (1982). Intracellular DNA of the parvovirus minute virus of mice is organized in a minichromosome structure, *J. Virol.*, **41**, 1094.
7. Berk A. J., Lee F., Harrison T., Williams J., Sharp P. A. (1979). Pre-early Ad5 gene product regulates synthesis of early viral mRNAs, *Cell*, **17**, 935.
8. Berns K. I., Adler S. (1972). Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains, *J. Virol.*, **9**, 394.
9. Berns K. I., Rose J. A. (1979). Evidence for a single stranded adenovirus-associated virus genome: Isolation and separation of complementary single strands, *J. Virol.*, **5**, 693.
10. Berns K. I., Cheung A. K.-M., Ostrove J. M., Lewis M. (1982). Adeno-associated virus latent infection. In: *Virus Persistence*, ed. by B. W. J. Mahy, A. C. Mirson, and G. K. Darby, p. 249, Cambridge University Press, Cambridge.
11. Berns K. I., Pinkerton T. C., Thomas G. F., Hoggan M. D. (1975). Detection of adeno-associated virus (AAV) specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells, *Virology* **68**, 556.
12. Bonnard G. D., Manders E. K., Campbell D. A., Jr., Herberman R. B., Collins M. J. (1976). Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4 lymphoma. Evidence for minute virus of mice causing the inhibition, *J. Exp. Med.*, **143**, 187.
13. Bourguignon G. J., Tattersall P. J., Ward D. C. (1976). DNA of a minute virus of mice: Self-priming, nonpermuted, single-stranded genome with a 5'-terminal hairpin duplex, *J. Virol.*, **20**, 290.

14. Buller R. M. L., Rose J. A. (1978). Characterization of adeno-associated virus polypeptides synthesized in vivo and in vitro. In: Replication of Mammalian Parvoviruses, Ed. by D. C. Ward, and P. Tattersall, p. 399, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
15. Buller R. M. L., Rose J. A. (1978). Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells, *J. Virol.*, 25, 331.
16. Buller R. M. L., Janik J. E., Sebring E. D., Rose J. A. (1981). Herpes simplex virus type 1 and 2 help adeno-associated virus replication, *J. Virol.*, 40, 241.
17. Carter B., Marcus C., Laughlin C., Ketner G. (1983). Properties of an adenovirus type 2 mutant, Ad2d/807, having a deletion near the right-hand genome terminus: Failure to help AAV replication, *Virology*, 126, 505.
18. Carter B. J. (1976). Intracellular distribution and polyadenilate content of adeno-associated virus RNA sequences, *Virology*, 73, 273.
19. Carter B. J., Laughlin C. A., de la Maza L. M., Myers M. (1979). Adeno-associated virus autointerference, *Virology*, 92, 449.
20. Carter B. J., Koczot F. J., Garrison J., Rose J., Dolin J. A. (1973). Separate function provided by adenovirus for adeno-associated virus multiplication, *Nature, New Biol.*, 244, 71.
21. Carter T. H., Blanton C. A. (1978). Possible role of the 72,000-dalton DNA binding protein in regulation of adenovirus type 5 early gene expression, *J. Virol.*, 18, 156.
22. Casto B. C., Goodheart C. R. (1972). Inhibition of adenovirus transformation in vitro by AAV-1, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140, 72.
23. Casto B. C., Atchison R. W., Hammond W. McD. (1967). Studies of the relationship between adeno-associated virus type 1 (AAV-1) and adenoviruses. I. Replication of AAV in certain cell cultures and its effects on helper adenovirus, *Virology*, 32, 52.
24. Chalberg S., Ketner G. (1981). Deletion mutants of adenovirus 2: Isolation and initial characterization of virus carrying mutations near the right end of the genome, *Virology*, 114, 196.
25. Cheung A. K.-M., Hoggan M. D., Hauswirth W. W., Berns K. I. (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells, *J. Virol.*, 33, 739.
26. Clinton G. M., Hayashi J. (1976). The parvovirus MVM: A comparison of heavy and light particle infectivity and their conversion in vitro, *Virology*, 74, 57.
27. Crawford L. V., Follet E. A. C., Burdon M. G., McGeoch D. J. (1969). The DNA of a minute virus of mice, *J. Gen. Virol.*, 4, 37.
28. Dawson G. J., Yates V. J., Chang P. W., Wattanavijarin W. (1981). Egg transmission of avian adeno-associated virus and CELO virus during experimental infections, *Am. J. Vet. Res.*, 42, 1833.
29. de la Maza L. M., Carter B. J. (1978). DNA structure of incomplete adeno-associated virus particles. In: Replication of Mammalian Parvoviruses, ed. by D. Ward and P. Tattersall, p. 193, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
30. de la Maza L. M., Carter B. J. (1980). Molecular structure of adeno-associated virus variant DNA, *J. Biol. Chem.*, 255, 3194.
31. de la Maza L. M., Carter B. J. (1981). Inhibition of adenovirus oncogenicity by adeno-associated virus DNA, *J. Natl. Cancer Inst.*, 67, 1323.
32. Ensinger M. J., Ginsberg H. S. (1971). Selection and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus, *J. Virol.*, 10, 328.
33. Faust E. A., Ward D. C. (1979). Incomplete genomes of the parvovirus minute virus of mice: Selective conservation of genome termini, including the origin for DNA replication, *J. Virol.*, 32, 276.

34. Fife K. H., Berns K. I., Murray K. (1977). Structure and nucleotide sequence of the terminal regions of adeno-associated virus DNA, *Virology*, **78**, 475.
35. Flint S. J., Broker T. R. (1980). Lytic infection by adenoviruses. In: *DNA Tumor Viruses*, ed. by T. Tooze, p. 443, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
36. Galos R. S., Williams J., Binger M., Flint S. J. (1979). Location of additional early gene sequences in the adenoviral chromosome, *Cell*, **17**, 945.
37. Gerry H. W., Kelly T. J., Jr., Berns K. L. (1973). Arrangement of nucleotide sequences in adeno-associated virus DNA, *J. Mol. Biol.*, **79**, 207.
38. Green M. R., Roeder R. G. (1980). Definition of a novel promoter for the major adeno-associated virus mRNA, *Cell*, **22**, 231.
39. Green M. R., Roeder R. G. (1980). Transcripts of the adeno-associated virus genome: Mapping of the major RNAs, *J. Virol.*, **36**, 79.
40. Green M. R., Straus S. E., Roeder R. G. (1980). Transcripts of the adeno-virus-associated virus genome: Multiple polyadenilated RNAs including a potential primary transcript, *J. Virol.*, **35**, 560.
41. Hallauer C., Kronauer G., Siegel G. (1971). Parvoviruses as contaminants of permanent human cell lines. I. Virus isolations from 1960—1970, *Arch. Ges. Virusforsch.*, **35**, 80.
42. Handa H., Carter B. J. (1979). Adeno-associated virus DNA replication complexes in herpes simplex or adenovirus-infected cells, *J. Biol. Chem.*, **254**, 6603.
43. Handa H., Shiroki K., Shimojo H. (1975). Complementation of adeno-associated virus growth with temperature-sensitive mutants of human adenovirus types 12 and 5, *J. Gen. Virol.*, **29**, 239.
44. Handa H., Shiroki K., Shimojo H. (1977). Establishment and characterization of KB cell lines latently infected with adeno-associated virus type 1, *Virology*, **82**, 84.
45. Harrison T., Graham F., Williams J. (1977). Host range mutants of adeno-virus type 5 defective for growth in HeLa cells, *Virology*, **77**, 319.
46. Hauswirth W. W., Berns K. I. (1977). Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication, *Virology*, **79**, 488.
47. Hauswirth W. W., Berns K. I. (1978). Initiation and termination of adeno-associated virus DNA replication. In: *Replication of Mammalian Parvoviruses*, ed. by D. C. Ward and P. Tattersall, p. 257, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
48. Hauswirth W. W., Berns K. I. (1979). Adeno-associated virus DNA replication: Non unit-length molecules, *Virology*, **93**, 57.
49. Hayward G. S., Bujard R., Gunther M. (1978). Three distinct replicative forms of Kilham-rat-virus DNA. In: *Replication of Mammalian Parvoviruses*, ed. by D. C. Ward and P. Tattersall, p. 327, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
50. Hoggan M. D. (1971). The parvoviruses. In: *Comparative Virology*, ed. by K. Maramorosch and E. Kurstak, p. 49, Academic Press, New York.
51. Hoggan M. D., Blacklow N. R., Rowe W. P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: Physical, biological and immunological characteristics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 1467.
52. Hoggan M. D., Thomas G. F., Thomas F. B., Johnson F. B. (1972). Continuous «carriage» of adenovirus associated virus genome in cell cultures in the absence of helper adenoviruses. In: *Proceedings of the Fourth Lepetit Colloquium*, Cocoyac, Mexico, p. 243, North-Holland, Amsterdam.
53. Janik J. E., Huston M. M., Rose J. A. (1981). Locations of adenovirus genes required for the replication of adenovirus-associated virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1925.
54. Janik E. J., Huston M. M., Cho K., Rose J. A. (1982). Requirement of adenovirus DNA-binding protein and VA-1 RNA for production of adeno-associated virus polypeptides, *J. Cell Biochem. (Suppl.)*, **6**, 209.



55. Jay F. T., Laughlin C. A., Carter B. J. (1981). Eukaryotic translational control: Adeno-associated virus protein synthesis is affected by a mutation in the adenovirus DNA binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2927.
56. Johnson F. B., Hoggan M. D. (1973). Structural proteins of HADEN-virus, *Virology*, **51**, 129.
57. Johnson F. B., Blacklow N. R., Hoggan M. D. (1972). Immunological reactivity of anti-sera prepared against the sodium dodecyl sulphate-treated structural polypeptides of adenovirus-associated virus, *J. Virol.*, **9**, 1017.
58. Johnson F. B., Ozer H. L., Hoggan M. D. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated virus type, 3, *J. Virol.*, **9**, 860.
59. Johnson F. B., Whitaker C. W., Hoggan M. D. (1975). Structural polypeptides of adenovirus-associated virus top component, *Virology*, **65**, 196.
60. Johnson F. B., Thomson T. A., Taylor P. A., Vlazny D. A. (1977). Molecular similarities among the adenovirus-associated virus polypeptides and evidence for a precursor protein, *Virology*, **82**, 1.
61. Jonas N., Shenk T. (1979). An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3665.
62. Kelly D. C., Bud H. M. (1978). Densonucleosis virus DNA: Analysis of fine structure by electron microscopy and agarose gel electrophoresis, *J. Gen. Virol.*, **40**, 33.
63. Kirschstein R. L., Smith K. O., Peters E. A. (1968). Inhibition of adenovirus 12 oncogenicity by adeno-associated virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **128**, 670.
64. Klessig D. F., Grodzicker T. (1979). Mutations that allow human Ad2 and Ad5 to express late genes in monkey cells map in the viral gene encoding the 72K DNA binding protein, *Cell*, **17**, 957.
65. Kollek R., Goulian M. (1981). Synthesis of parvovirus H-1 replicative form from viral DNA by DNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6206.
66. Kollek R., Tseng B. Y., Goulian M. (1980). Studies on the effect of inhibitors of DNA polymerase on synthesis of parvovirus H-1 DNA, *J. Supramol. Struct. (Suppl.)*, **4**, 332.
67. Kollek R., Tseng B. Y., Goulian M. (1982). DNA polymerase requirements for parvovirus H1 DNA replication in vitro, *J. Virol.*, **41**, 982.
68. Kongsvik J. R., Toolan H. W. (1971). Capsid components of parvovirus H-1, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139**, 1202.
69. Koczot F. J., Carter B. J., Garon C. F., Rose J. A. (1973). Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 215.
70. Lassam N. J., Bayley S. T., Graham F. L. (1978). Synthesis of DNA, late polypeptides, and infectious virus by host-range mutants of adenovirus 5 in non-permissive cells, *Virology*, **87**, 463.
71. Laughlin C. A., Jones N., Carter B. J. (1982). Effect of deletions in adenovirus early region I genes upon replication of adeno-associated virus, *J. Virol.*, **41**, 868.
72. Laughlin C. A., Westphal H., Carter B. J. (1979). Spliced adenovirus-associated virus RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5567.
73. Laughlin C. A., Myers M. W., Risin D. L., Carter B. J. (1979). Defective-interfering particles of the human parvovirus adeno-associated virus, *Virology*, **94**, 162.
74. Li A. T., Lavelle G. C., Tannant R. W. (1978). DNA replication of Kilham rat virus: Characterization of intracellular forms of viral DNA extracted by guanidine hydrochloride. In: *Replication of Mammalian Parvoviruses*, ed. by D. C. Ward and P. Tattersall, p. 341, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

75. Lum G. S., Schreiner A. W. (1963). Study of a virus isolated from a chloro-leukemic Wistar rat, *Cancer Res.*, **23**, 1742.
76. Lusby E. W., Berns K. I. (1982). Mapping of the 5' termini of two adeno-associated virus 2 RNAs in the left half of the genome, *J. Virol.*, **41**, 518.
77. Lusby E., Bohenzky R., Berns K. I. (1981). The inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA: Independence of orientation at either end of the genome, *J. Virol.*, **37**, 1083.
78. Lusby E., Fife K. H., Berns K. I. (1980). Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA, *J. Virol.*, **34**, 402.
79. Majaniemi I., Tratschin J. D., Siegl G. (1981). A reassessment of the nucleic acid and protein components of parvovirus LuIII, Abstracts Vth International Congress of Virology (P39/07), p. 366.
80. Mayor H. D., Houlditch G. S., Mumford D. M. (1973). Influence of a adeno-associated satellite virus on adenovirus-induced tumors in hamsters, *Nature (Lond.)*, *New Biol.*, **241**, 44.
81. Mayor H. D., Torikai K., Melnick J., Mandel M. (1969). Plus and minus single-stranded DNA separately encapsidated in adeno-associated satellite virions, *Science*, **166**, 1280.
82. McMaster G. K., Beard P., Engers H. K., Hirt B. J. (1981). Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to minute virus of mice, *J. Virol.*, **38**, 317.
83. McPherson R. A., Rose J. A. (1983). Structural proteins of adenovirus-associated virus: Subspecies and their relatedness, *J. Virol.*, **46**, 523.
84. McPherson R. A., Ginsberg H. S., Rose J. A. (1983). Adeno-associated virus helper activity of adenovirus DNA binding protein, *J. Virol.*, **44**, 666.
85. Muller H. P., Gautschi M., Siegel G. (1978). Defective particles of parvovirus LuIII. In: *Replication of Mammalian Parvoviruses*, ed. by D. C. Ward and P. Tattersall, p. 231, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
86. Myers M. W., Carter B. J. (1981). Adeno-associated virus replication. The effect of L-canavaline or a helper virus mutation on accumulation of viral capsids and progeny single-stranded DNA, *J. Biol. Chem.*, **256**, 567.
87. Myers M. W., Laughlin C. A., Jay F. T., Carter B. J. (1980). Adenovirus helper function for growth of adeno-associated virus: Effect of temperature sensitive mutations in adenovirus early gene region 2, *J. Virol.*, **35**, 65.
88. Nevins J. R., Winkler J. (1980). Regulation of early adenovirus transcription: A product of early region 2 specifically represses region 4 transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1993.
89. Ostrove J. M., Berns K. I. (1980). Adenovirus early region Ib gene function required for rescue of latent adeno-associated virus, *Virology*, **104**, 502.
90. Ostrove J. M., Duckworth D. H., Berns K. I. (1981). Inhibition of adenovirus-transformed cell oncogenicity by adeno-associated virus, *Virology*, **113**, 521.
91. Parks W. P., Melnick J. L., Rongey R., Mayor H. D. (1967). Physical accay and growth cycle studies of a defective adeno-satellite virus, *J. Virol.*, **1**, 171.
92. Pintel D., Dadachanji D., Astell C. R., Ward D. C. (1983). The genome of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units, *Nucl. Acids Res.*, **11**, 1019.
93. Pritchard C., Stout E. R., Bates R. C. (1981). Replication of parvoviral DNA. I. Characterization of a nuclear lysate system, *J. Virol.*, **37**, 352.
94. Revie D., Tseng B. Y., Gratstrom R. H., Goulian M. (1979). Covalent association of protein with replicative form DNA of parvovirus H-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5539.
95. Rhode S. L. (1973). Replication of the parvovirus H-1. Kinetics in a para-synchronous cell system, *J. Virol.*, **11**, 856.

96. Rhode S. L. (1978). Defective interfering particles of parvovirus H-1, *J. Virol.*, **27**, 347.
97. Rhode S. L. (1978). Replication process of the parvovirus H-1. X. Isolation of a mutant defective in replicative form DNA replication, *J. Virol.*, **25**, 215.
98. Rhode S. L., Klaassen B. (1982). DNA sequence of the 5'-terminus containing the replication origin of parvovirus replicative form DNA, *J. Virol.*, **41**, 990.
99. Rhode S. L., Paradiso P. R. (1983). Parvovirus genome: Nucleotide sequence of H1 and mapping of its genes by hybrid arrest translations, *J. Virol.*, **45**, 173.
100. Richardson W. D., Westphal H. (1981). A cascade of adenovirus early function is required for expression of adeno-associated virus, *Cell*, **27**, 133.
101. Richardson W. D., Carter B. J., Westphal H. (1980). Vero cells injected with adenovirus type 2 mRNA produce authentic viral polypeptide patterns: Early mRNA promotes growth of adenovirus-associated virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 931.
102. Rose J. A., Kocot F. (1972). Adenovirus-associated virus multiplication. VII. Helper requirement for viral deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid synthesis, *J. Virol.*, **10**, 1.
103. Rose J. A., Berns K. I., Hoggan M. D., Kocot F. J. (1969). Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: Formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 863.
104. Rose J. A., Maizel J. V., Jr., Inman J. K., Shatkin A. J. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated viruses, *J. Virol.*, **8**, 766.
105. Salzman L. A., Fabisch P. (1979). Nucleotide sequence of the self-priming 3' terminus of the single-stranded DNA extracted from the parvovirus KPV, *J. Virol.*, **30**, 946.
106. Salzman L. A., White W. L. (1979). Structural proteins of Kilham rat virus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1551.
107. Samulski R. J., Berns K. I., Tan M., Muzyczka N. (1982). Cloning of AAV into pBR322: Rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2077.
108. Samulski R. J., Srivastava A., Berns K. I., Muzyczka N. (1983). Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: Gene corrections within the terminal repeats of AAV, *Cell*, **33**, 135.
109. Shenk T., Jones N., Colby W., Fowlkes D. (1980). Functional analysis of adenovirus 5 host-range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 367.
110. Siegel G., Gautschi M. (1978). Purification properties of replicative-form and replicative-intermediate DNA molecules of parvovirus LuIII. In: *Replication of Mammalian Parvoviruses*, ed. by D. C. Ward and P. Tattersall, p. 315, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
111. Srivastava A., Lusby E. W., Berns K. I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome, *J. Virol.*, **45**, 555.
112. Stillman B. W., Tomanoi F., Matthews M. B. (1982). Purification of an adenovirus-coded DNA polymerase that is required for initiation of DNA replication, *Cell*, **31**, 613.
113. Stillman B. W., Lewis J. B., Chow L. T., Matthews M. B., Smart J. E. (1981). Identification of the gene for the adenovirus terminal protein precursor, *Cell*, **23**, 497.
114. Straus S. E., Ginsberg H., Rose J. A. (1976). DNA-minus temperature sensitive mutants of adeno-associated virus replication, *J. Virol.*, **17**, 149.
115. Straus S. E., Sebring E., Rose J. A. (1976). Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 742.



116. *Tattersall P.* (1978). Susceptibility to minute virus of mice as a function of host-cell differentiation. In: *Replication of Mammalian Parvovirus*, ed. by D. C. Ward and P. Tattersall, p. 131, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
117. *Tattersall P., Shatkin A., Ward D.* (1977). Sequence overlap between the structural polypeptides of parvovirus MVM, *J. Mol. Biol.*, **11**, 375.
118. *Torikai K., Ito M., Jordan L. E., Mayor H. D.* (1970). Properties of light particles produced during growth of type 4 adeno-associated satellite virus, *J. Virol.*, **6**, 363.
119. *Van der Vliet P. C., Levine A. J., Ensinger M. J., Ginsberg H. S.* (1975). Thermolabile DNA binding proteins from cells infected with a temperature-sensitive mutants of adenovirus defective in viral DNA synthesis, *J. Virol.*, **15**, 348.
120. *Walter S., Richards R., Armentrout R. W.* (1980). Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus, *Biochim. Biophys. Acta*, **607**, 420.
121. *Ward D. C., Dadachanji D.* (1978). Replication of minute-virus-of-mice DNA. In: *Replication of Mammalian Parvoviruses*, ed. by D. C. Ward and P. Tattersall, p. 197, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

## Аденовирусы и их репликация

*Маршал С. Хорвиц*<sup>1</sup>

Аденовирусы как отдельные вирусные агенты были впервые описаны в 1953 г. Роу и соавторами [258], когда они попытались получить линии клеток из тканей миндалин и аденоидов, удаленных у детей. При этом им удалось выделить передающийся агент, вызывающий дегенерацию эпителиальных клеток. Сходные вирусные агенты были выделены от военных, болеющих различными респираторными заболеваниями, сопровождающимися лихорадкой [119]. Показано, что существует множество серотипов этих новых агентов и что среди первых серотипов шесть антигенно родственны: имеют общий группоспецифический комплементсвязывающий антиген [133]. Сначала эти вирусы называли adenoid degeneration (AD) (вызывающие дегенерацию аденоидов), adenoid-pharyngeal conjunctival (APC) (аденофарингоконъюнктивитные) и acute respiratory disease (ARD) agents (агенты острых респираторных заболеваний). Современная номенклатура аденовирусов была принята в 1956 г. [66]. Эпидемиологическое изучение, предпринятое Комиссией по острым респираторным заболеваниям при армии США, подтвердило, что аденовирусы (для краткости будем обозначать их Ad) являются причиной большого числа острых респираторных синдромов с лихорадкой среди военных [50, 61].

Острые респираторные синдромы, вызываемые аденовирусами, были известны более чем за 100 лет до описания этой группы вирусов [61]. Кроме того, аденовирусы были выделены во время вспышек эпидемических кератоконъюнктивитов (ЭКК), которые были описаны как отдельное заболевание немецкими клиницистами в 1920-х гг. [121, 140]. По мере увеличения числа серотипов аденовирусов человека (в настоящее время их насчитывается 41) с ними связывали различные клинические синдромы [56, 330]. Например, аденовирусы могут вызывать острые геморрагические циститы [217]. В 1962 г. был описан первый случай, когда патогенный вирус человека индуцировал злокаче-

---

<sup>1</sup> Marshall S. Horwitz, Departments of Microbiology. — Immunology, Cell Biology and Pediatrics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York 10461.

ственные опухоли у животных — Ad 12 вызвал появление опухолей у грызунов [303]. Онкогенный потенциал аденовирусов послужил стимулом их дальнейшего молекулярно-биологического изучения, что позволило детально понять многие аспекты литического и трансформирующего циклов. Однако пока нет убедительных данных о связи аденовирусов с какими-либо злокачественными опухолями человека [107a].

Многие стадии репликации аденовирусов изучали как модель более общих внутриклеточных процессов. Вирус-специфические мРНК аденовирусов синтезируются в ядре и переносятся в цитоплазму к полисомам. В процессе изучения биогенеза аденовирусных мРНК открыто важное явление — сплайсинг [16, 44a, 48]. Помимо этого были также разработаны методики картирования геномной локализации мРНК Ad, которые затем были применены для многих вирусных и эукариотических систем. В частности, широко используются гибридационный блок трансляции (hybrid arrested translation, HART) [248] и картирование с помощью нуклеазы S1 [17]. Первое успешное исследование инициации репликации эукариотической ДНК *in vitro* было проведено с экстрактами клеток, зараженных Ad2 [37]. В этих исследованиях были открыты вирусные и хозяйские (эукариотические) факторы инициации синтеза новой цепи ДНК с использованием нового механизма белковой затравки [177, 246]. Перенос полипептидов в цитоплазму и сборка различных белок-нуклеиновых промежуточных комплексов в цитоплазме и ядре послужили основой модельных систем транспорта и сборки [130]. *ts*-Мутанты по каждой из этих функций позволили определить ассамблирующие белки для сборки основного белка оболочки Ad [179, 220, 333]. Эти наблюдения и многие другие, обсуждаемые в данной главе, поставили аденовирусы в особое положение биологического инструмента, чрезвычайно полезного для изучения сложных процессов в эукариотических системах. Обсуждение клинических симптомов, эпидемиологии и методов диагностики аденовирусной инфекции дано в гл. 24. Описание трансформации клеток аденовирусами можно найти в гл. 12.

## Структура вируса

### Размер, форма и химический состав

Аденовирусы лишены липопротеиновой оболочки, они имеют форму икосаэдра (20 треугольных поверхностей и 12 вершин) диаметром от 65 до 80 нм [122] (рис. 28.1). От каждой из вершин икосаэдра отходит структурный компонент, называемый «фибрилла». Его длина варьирует у различных серотипов аденовирусов [214, 215]. Белковая оболочка (капсид) состоит из



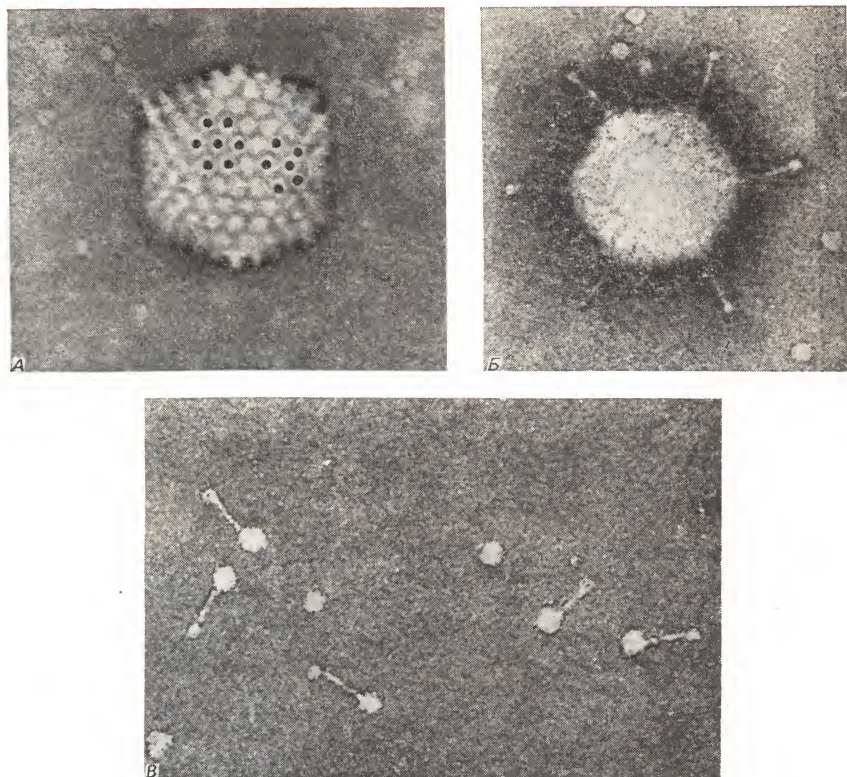


Рис. 28.1. Электронная микрофотография аденовируса типа 5 (Ad5). А. Вирион имеет форму икосаэдра. Каждый из 240 гексонов окружен шестью идентичными гексонами и каждый из 12 пентонов окружен пятью гексонами (отмечены на рисунке). Б. Видны шесть из 12 фибрилл, отходящих от вершин капсомера пентона. В. Свободные капсомеры пентона, содержащие основание пентона и фибриллу.  $\times 285\,000$ . (С разрешения из [304].)

252 субъединиц (капсомеров), 240 из которых — гексоны и 12 — пентоны [96]. Пентон содержит основание пентона на поверхности капсида и отходящую от основания фибриллу. Каждый пентон окружен пятью гексонами, благодаря чему он и получил название «пентон». Все другие капсомеры — гексоны, которые называются так потому, что каждый соседствует с шестью идентичными структурами. Наномеры (группы из 9 гексонов) могут быть получены при мягком лизисе частиц 10%-ным пиридином [239], причем каждый наномер соответствует одной из 20 треугольных поверхностей. Гексоны и пентоны содержат разные вирусные полипептиды [191] (рис. 28.2). Разрушение

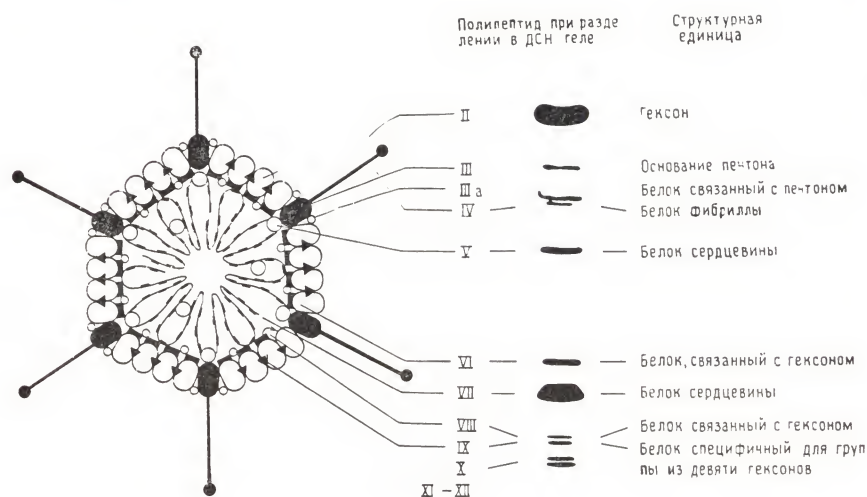


Рис. 28.2. Схематическое изображение аденовируса. Справа показаны подвижность и относительные количества каждого белка после диссоциации вируса по данным ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле. Стрелками указано положение каждого полипептида в вирионе, однако конфигурация ДНК не соответствует ее действительной структуре в сердцевине. Полипептиды обозначены римскими цифрами [192]; гексон (II), основание пентона (III), фибрилла (IV) и ассоциированные с гексоном белки (IIIa, VI, VIII и IX) являются субъединицами капсида. В сердцевине содержатся белки V, VII,  $\mu$  и 55K-концевой белок (ТР), ковалентно связанный с каждым из 5'-концов ДНК. Белка ТР слишком мало (две молекулы на вирион), чтобы выявить его с помощью окрашивания геля кумасси;  $\mu$  — один из полипептидов, обнаруженных в участке геля, содержащем белки X—XII. (С разрешения из [229].)

вириона 5M мочевиной [192], 10%-ным пиридином [239], ацетоном [162] или путем многократного замораживания — оттаивания приводит к освобождению внутренней структуры (сердцевины), состоящей из двухцепочечной ДНК с четырьмя вирусными белками, не входящими в состав капсида [132, 192, 250]. Аденовирусы содержат 13% ДНК и 87% белка, не содержат мембран или липидов, и поэтому они стабильны в таких растворителях, как эфир и этанол [104]. Вирионы содержат полипептиды фибриллы, модифицированные глюкозамином, который присоединен к ним ковалентно. Плавающая плотность аденовирусов в CsCl составляет 1,34 г/см<sup>3</sup> [138].

### Вирионная ДНК

Молекулярная масса вирусной ДНК аденовирусов ( $23,85 \cdot 10^6$  для Ad2) незначительно варьирует в зависимости от сероти-

па [106], а ее длина составляет  $\sim 11$  мкм. Эта ДНК имеет характерную особенность: на 5'-конце линейного генома ковалентно связан с dCMP кодируемый вирусом концевой полипептид 55 К (ТР, от англ. terminal polypeptide). Глубокий гидролиз протеолитическими ферментами не удаляет все аминокислоты с 5'-концевого dCMP, однако связь белок — ДНК, включающая гидроксильную группу серина, лабильна в NaOH или пиперидине [38, 293]. ТР не позволяет ковалентно связанным с ним фрагментам ДНК входить в процессе электрофореза без детергентов в агарозный гель, поэтому концевые фрагменты ДНК новых серотипов можно легко определить [149]. По данным электронной микроскопии примерно половина молекул ДНК Ad, освобожденных из вирионов обработкой 4М гуанидинхлоридом, имеет вид колец, образующихся в результате нековалентного взаимодействия между концевыми белками каждого из концов [250] (рис. 28.3). В состав ДНК аденовирусов входят инвертированные концевые избыточные последовательности [90, 337], длина которых варьирует от 100 до 140 бр в зависимости от серо-

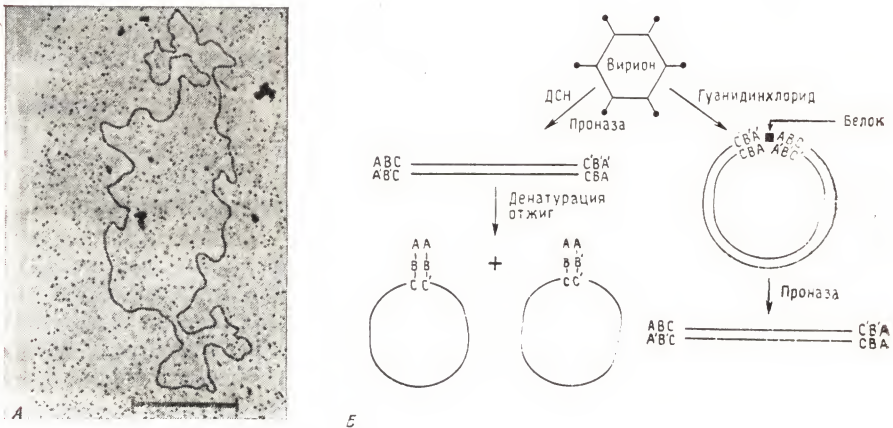


Рис. 28.3. Структура ДНК аденовируса. А. Электронная микрофотография молекулы ДНК аденовируса, выделенной из вириона с помощью 4М гуанидина. Кольцевая структура удерживается благодаря взаимодействию белков, ковалентно связанных с каждым из 5'-концов в ДНК (с разрешения авторов из [250]). Б. Схематическая диаграмма структуры аденовирусной ДНК, изображенной на фотографии А, а также ДНК в других возможных конфигурациях. Представлены инвертированные концевые повторы (ABC — A'B'C'), длина которых варьирует от 100 до 140 бр у различных серотипов. После депротенинизации денатурированная ДНК может реассоциировать с образованием одноцепочечных колец. Структура этих колец удерживается благодаря дуплексам на концах молекулы. Концевые структуры двухцепочечных молекул и реассоциировавших одноцепочечных кольцевых структур идентичны. (С разрешения из [167].)



типа [7, 276, 302 b]. Поэтому денатурированные цепи ДНК аденовирусов могут давать кольца за счет водородных связей между основаниями на концах одной и той же цепи. Образующиеся при этом структуры «сковорода с ручкой», возможно, важны для репликации ДНК (см. ниже) (рис. 28.3). Для аденовирусов серотипов 2, 3, 5, 7а, 7 и 12 существуют подробные рестрикционные карты [27b, 302]. Содержание GC-пар варьирует в разных серотипах от 48 до 61 % [102, 234], причем их содержание является одним из критериев для классификации аденовирусов человека. В настоящее время доступно довольно много данных по первичной структуре аденовирусной ДНК, особенно для Ad2, 5, 7 и 12 [27 b, 302, 314a]. Чувствительные реципиентные клетки можно трансфицировать ДНК аденовирусов, используя методику с фосфатом кальция. Если ТР не удалять с помощью протеолиза, то эффективность трансфекции увеличивается примерно в 100 раз [265].

### Вирионные полипептиды

Общее число полипептидов определили методом электрофореза компонентов очищенных вирионов, диссоциированных в присутствии додецилсульфата натрия [191]. В разных работах оно варьирует от 11 до 15 [323].

### Капсид

Наиболее детальное структурное изучение полипептидов Ad было проведено для Ad2 и 5, и ниже мы обсуждаем результаты, полученные на Ad2. Различия в молекулярных массах между аналогичными белками различных серотипов невелики, но их удалось использовать в одной из схем классификации аденовирусов [298, 319]. На рис. 28.2 показаны полипептиды аденовирусов и их положение в вирионе. Полипептид I отсутствует, поскольку исходно обозначенный цифрой I полипептид оказался смесью меньших полипептидов, которые плохо диссоциировали [191]. Полипептид II представляет собой 120К-белок гексона<sup>1</sup>. Гексоновый капсомер — это тример, состоящий из трех идентич-

<sup>1</sup> Некоторые детали номенклатуры аденовирусов в настоящее время уточняются. Для полностью секвенированной ДНК Ad2 позиции генетической карты от 0 до 100 могут быть точно определены и обозначены по номерам нуклеотидов [314a]; см. также данные Банка последовательностей оснований ДНК, Р. Дж. Робертс, Лаборатория Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, личное сообщение). Секвенирование позволяет, кроме того, уточнить молекулярные массы полипептидов в соответствии с открытыми рамками считывания. В данной главе, однако, будут использованы главным образом величины в единицах карты (ед. карты) и молекулярные массы по данным, опубликованным в литературе.

ных полипептидов (II), прочно связанных друг с другом нековалентными связями [129]. Таким образом, 240 гексоновых капсомеров в каждом вирионе содержат 720 идентичных полипептидов. После различных процедур выделения полипептиды VI (24K), VIII (13K) и IX (12K) остаются связанными с гексоном [72]. Например, после разрушения вирионов 10%-ным пиридином полипептиды VI и IX выделяются вместе с наномерами гексона. Полипептиды VI и VIII синтезируются в виде больших предшественников и нарезаются в процессе сборки [21]. Положение этих белков внутри вириона показано на рис. 28.2, где указаны полипептиды, обращенные к наружной стороне частицы [71]. Локализация полипептидов была установлена при мечении поверхности вириона с помощью иодированной лактопероксидазы или путем анализа различных продуктов деградации при осторожном разрушении частиц. Основание пентона (полипептид III, 85K) нековалентно связано с фибриллой (полипептид IV, 62K). На каждую вершину приходится пять молекул полипептида III (основание пентона) и три молекулы полипептида IV (фибрилла). После диссоциации вирионов пиридином полипептид IIIa (66K) ассоциирован с перипентоновыми гексонами [71, 72].

### **Сердцевина**

Полипептиды V (48,5K) и VII (18,5K) связаны нековалентно с вирусной ДНК во внутренней структуре (сердцевине), которую можно получить при разрушении вириона 10%-ным пиридином [239]. Однако после обработки саркозилом сердцевина не содержит полипептида V [28]. Все основные белки сердцевины богаты аргинином, так же как клеточные гистоны, но в отличие от последних они не содержат триптофана [162, 192, 258a]. Сердцевина каждого вириона содержит 1070 молекул полипептида VII и всего 180 молекул белка V [72]. Другой белок сердцевины  $\mu$ , богатый аргинином (54%) и гистидином (13%), имеет мол. массу 4K, но его точная локализация и функция до сих пор не известны [132]. Белок V способен связываться с основанием пентона и, возможно, выполняет свою функцию при упаковке вирионной ДНК. Полипептид IIIa также может служить связующим звеном между белком VII и окружающими пентон гексонами капсида [71, 72]. Концевой белок 55K (TP) ковалентно связан с каждым концом ДНК; впервые на его присутствие указали кольца вирионной ДНК, выделенной без обработки протеазами [250]. TP визуально обнаружены с помощью авидин-биотиновой метки. Авидин связывали с ферритином, а биотин — с эфиром N-гидроксисукцинамида, который избирательно реагирует с остатками лизина в полипептиде [27a]. pTP — 80K- предше-

ственник ТР [39], и рVII являются исходными продуктами трансляции, расщепление которых происходит в процессе вирусного морфогенеза [182, 321, 322, 323].

Разрушение сердцевины аденовирусов небольшими количествами микрооккковой нуклеазы не приводит к образованию типичных нуклеосомных структур, подобных тем, которые обнаружены в клеточном или вирусном (SV40) хроматине, однако следует отметить определенную однородность продуктов гидролиза, характерную для такого разрушения [51]. Частичный гидролиз сердцевины аденовирусов нуклеазой приводит к образованию популяции молекул ДНК ( $\sim 150$  бр), дающих в геле размытую зону. Эта ДНК в комплексе с шестью молекулами полипептида VII формирует нуклеосомоподобные структуры [203]. Каждая из этих структур (нуклеосом) соединена с соседней нуклеосомой варьирующим по длине фрагментом ДНК, связанным с одной молекулой белка V.

Средняя длина ДНК, приходящаяся на одну нуклеосому, включая спейсерную ДНК, составляет примерно 200 бр. По данным электронной микроскопии нуклеосомы расположены на ДНК нерегулярно. Шесть молекул белка VII в нуклеосоме входят в состав трех димеров. Такая схема организации основана на результатах опытов по сшивке глутаральдегидом (при которой образуются ковалентно связанные димеры) с дальнейшей обработкой нуклеазой, в результате которой образуются фрагменты ДНК, содержащие 50 бр. Молекулярная масса белка VII (110K) сходна с молекулярной массой октамерного гистона (108K) в нуклеосомах хроматина. Однако белок V сердцевины (48K) намного больше гистона H1, занимающего эквивалентное положение на последовательности ДНК между нуклеосомами. Последние данные позволяют предположить, что полипептид X — это  $\mu$ -белок, продукт расщепления вирионного белка, который также, вероятно, связан с сердцевиной. Происхождение X не окончательно установлено, но отмечено, что его нет в сердцевинах, очищенных из вирионов мутанта, температурочувствительного по функции вирусной протеазы [73, 74, 203]. Предложено несколько моделей упаковки вирусной сердцевины с учетом ее взаимодействия или с 20 гранями икосаэдра, или с его 12 вершинами [51]. Благодаря взаимодействию с белками сердцевины аденовирусная ДНК компактизована по длине в 5,5 раза [203].

### Функции структурных белков

Для серологической классификации аденовирусов используют антигенные детерминанты гексона, пентона и фибриллы. Все серотипы аденовирусов человека дают перекрестные реакции благодаря группоспецифическому антигену [214], распо-



женному на внутренней поверхности капсомера гексона. Антигенную детерминанту  $\alpha$  легко обнаружить в «растворимом» белке гексона (лишь  $1/10$  часть популяции молекул синтезированного гексона включается в вирион), но ее нельзя обнаружить в интактном вирионе [304].  $\epsilon$ -Детерминанта гексона и  $\gamma$ -детерминанта фибриллы относятся к типоспецифическим антигенам, расположенным на поверхности частиц аденовирусов; в ответ на них синтезируются нейтрализующие антитела [233].  $\gamma$ -Антигенность, по-видимому, идентична типоспецифическому гемагглютиниру. Для количественного определения аденовирусной гемагглютинирующей активности, которая является свойством фибриллы (как в составе вириона, так и в растворимой фракции экстрактов зараженных клеток), используют эритроциты крыс и макаков-резусов [253]. По характеру поведения в реакции гемагглютинации аденовирусы разделяют на четыре подгруппы [118]. Очищенная фибрилла ингибирует синтез макромолекул при добавлении к незараженным клеткам, имеющим на своих мембранах рецепторы для аденовирусов [166]. Кристаллизованные препараты фибриллы оказывают ингибирующее действие на клетки человека и клетки ВНК21, но не на мышинные клетки L929.

Другие функции структурных белков аденовирусов связывают с полипептидом основания пентона. Растворимый пентон токсичен для клеток и вызывает быстрый цитопатический эффект (ЦПЭ) в клеточном монослое [304]. По данным световой микроскопии ЦПЭ, вызываемый пентоном, очень похож на ЦПЭ, вызываемый инфекционными аденовирусами, но первый возникает значительно быстрее (через 4—6 ч).

С пентоном ассоциированы две эндонуклеазы: 1) эндонуклеаза, осуществляющая двухцепочечный разрыв (ds-эндонуклеаза), которая осаждается антисывороткой против очищенного белка основания пентона [31], и 2) эндонуклеаза, осуществляющая одноцепочечный разрыв (ss-эндонуклеаза), ассоциированная со структурами, содержащими пентон (вирион и очищенные полипептиды) [195]. По-видимому, ни ds-, ни ss-эндонуклеаза не кодируются вирусом, поскольку недавно удалось разделить эти эндонуклеазы и белок основания пентона [226].

### Неструктурные вирус-специфические полипептиды

Существуют и другие вирус-специфические полипептиды, однако они не входят в состав зрелых вирионов. Здесь мы лишь кратко остановимся на некоторых из неструктурных полипептидов, а в специальных разделах обсудим их более подробно. Это относится, например, к полипептиду 100K — позднему белку, ис-

пользуемому в качестве «лесов» при сборке тримеров гексона из мономеров [36, 220]. Кодированный вирусом ДНК-связывающий белок (72К по подвижности в полиакриламидном геле и 58К по нуклеотидной последовательности кодирующего участка) представляет собой продукт ранних генов, необходимый для элонгации ДНК [84]. Полипептид 100К и ДНК-связывающий белок синтезируются в количествах, достаточных для того, чтобы их можно было обнаружить при введении радиоактивно меченных аминокислот в зараженные клетки. Два других вирусных полипептида, необходимые для репликации ДНК [177],—это ДНК-полимераза (140К), синтезирующаяся в очень малых количествах, и 80К-предшественник концевой белка, действующего как затравка при инициации. Полипептиды 140К и 80К удалось обнаружить только после тщательной очистки из большого количества клеток HeLa, зараженных Ad2.

В результате трансляции *in vitro* выявлены другие радиоактивные полипептиды, которые кодируются участками вирусной ДНК и обладают регуляторными функциями. Полипептид 51К синтезируется как продукт предраннего гена *E1A* (см. ниже «Ранняя транскрипция»); он, по-видимому, важен для регуляции других ранних функций [249, 275]. Опухолевые антигены (58К, 30—50К и 17К) аденовирусов синтезируются в малых количествах и могут быть обнаружены в результате иммунопреципитации меченых экстрактов сыворотками животных, несущих опухоли, индуцированные аденовирусами [198, 249, 255]. Функции других малых полипептидов 15К, 13,5К и 11,5К, которые можно картировать при трансляции *in vitro* мРНК, гибридизирующихся с определенными участками Ad2 ДНК, остаются неизвестными.

## Классификация

Аденовирусы относятся к сем. *Adenoviridae*, которое подразделяется на два рода: *Mastadenovirus* и *Aviadenovirus* [216]. Хотя существуют широкие антигенные перекресты по гексоновым комплементсвязывающим антигенам внутри каждого рода, нет общего антигена, который характеризовал бы семейство в целом. Род *Mastadenovirus* включает в себя вирусы человека, обезьян, крупного рогатого скота, лошадей, свиней, овец, собак и опоссума.

## Гемагглютинация эритроцитов крыс или макаков-резусов

Первоначальная классификация аденовирусов человека была основана на характере агглютинации эритроцитов крыс и макаков-резусов [253], а затем она была усовершенствована с

Таблица 28.1. Классификация аденовирусов человека (Mastadenovirus H)<sup>1</sup>

Под- группа	Группы по гемагглютинации	Серотипы	Онкогенный потенциал		Содержа- ние (G+C) в ДНК, %
			опухоли у животных	трансформа- ция в куль- туре ткани	
A	IV (незначительная или отсутствие аг- глютинации)	12, 18, 31	Высокий	+	48—49
B	I (полная агглюти- нация эритроци- тов обезьяны)	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	Средний	+	50—52
C	III (частичная агглю- тинация эритроци- тов крысы)	1, 2, 5, 6	Низкий или отсутст- вует	+	57—59
D	II (полная агглюти- нация эритроци- тов крысы)	8, 9, 19, 37, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22—30, 32, 33, 36, 38, 39	То же	+	57—61
E	III	4	»	+	57—59
F	III	40	Неизвестен		
G	III	41	»		

<sup>1</sup> Из [12] с модификациями.

включением в нее новых изолятов [118]. По характеру гемагглютинации были определены четыре группы, которые можно рассматривать как компоненты более поздней схемы классификации, включающей все известные сегодня аденовирусы человека (табл. 28.1). Гемагглютинирующими свойствами обладает полипептид фибриллы.

### Онкогенность для грызунов

Впервые способность аденовирусов типа 12 вызывать опухоли открыта в опытах на хомячках. Вскоре было показано, что аденовирусы значительно различаются по онкогенности для грызунов. Эти биологические различия послужили основой для еще одной схемы их классификации [133]. За редкими исключениями, вирусы, объединенные по гемагглютинирующим свойствам, имели сходные онкогенные свойства.



### Состав оснований и гомология ДНК

Эти два свойства вирусной ДНК широко изучались и стали дополнительными критериями при классификации аденовирусов человека [234]. Низкое содержание G + C (48%) у аденовирусов группы А коррелирует со способностью вирусов этой группы индуцировать опухоли, в то время как вирусы группы С с более высоким содержанием G + C — 58% — неонкогенны [102, 234]. Однако сопоставление данных по содержанию G + C у онкогенного вируса обезьян SA7 (58—60%) и у неонкогенных вирусов обезьян (54%) показывает, что состав оснований указывает скорее не на способность вирусов к индукции опухолей, а на их генетическое происхождение или эволюционные вариации серотипа [100, 235].

По данным гибридизации ДНК—ДНК гомология оснований внутри группы составляет в основном более 85%, за исключением группы А, в которой гомология между ее тремя членами составляет от 48 до 69% [91, 102]. Наиболее вариабельными внутри группы являются участок от 52 до 62 ед. карты генома, кодирующий капсомер гексона, и участок от 78 до 91 единиц, кодирующий белок фибриллы и ранний гликопротеин (Е3), который не нужен для репродукции вируса в культуре ткани [91]. Гексоны и фибриллы расположены на поверхности вириона и являются полипептидами, к которым вырабатываются хозяйские антитела. Природные варианты гексона и фибриллы, возникающие в популяции вирионов, вероятно, отбираются иммунным ответом хозяина на основные антигенные детерминанты в процессе инфекции, и поэтому эти полипептиды сильнее варьируют по составу, чем некоторые внутренние вирусные полипептиды. По данным гибридизации гомология между группами аденовирусов от А до F составляет менее 20%, однако при сравнении первичной структуры участков от 0 до 30 ед. карты групп А, В и С обнаружено, что консервативны от 50 до 80% оснований.

Аденовирусы различных групп не рекомбинируют, хотя существуют полипептиды, которые могут участвовать в комплементации между неродственными серотипами. Внутри группы вирусы могут рекомбинировать весьма эффективно [259]. Результаты рекомбинации подтверждают взаимоотношения между аденовирусами, на основании которых построена предложенная классификация. В настоящее время нет экспериментальных данных, которые объясняли бы отсутствие рекомбинации между вирусами разных групп.

### Взаимосвязи между Т-антигенами

Связи между опухолевыми (7) антигенами легли в основу еще одной схемы классификации [190]. Члены группы обычно имеют по крайней мере одну общую Т-антигенную детерминан-

ту. Определение Т-антигенов недавно усовершенствовано благодаря тому, что удалось определить полипептиды, вносящие свой вклад в серологические реакции. Первоначально Т-антигенами называли антигены, которые реагировали с антителами хомячков, несущих опухоли, вызванные аденовирусами [93]. Поскольку структурные вирусные компоненты в таких опухолях обычно отсутствуют, Т-антигены не содержат белков гексона, пентона и фибриллы. Более точное определение Т-антигена должно быть ограничено продуктами ранних областей *E1A* и *E1B*, которые непосредственно принимают участие в аденовирусной трансформации [98]. Однако, поскольку для классификации, основанной на свойствах Т-антигена, использовали антисыворотку, содержащую антитела к большому числу ранних полипептидов аденовирусов, групповые взаимосвязи между Т-антигенами могут определяться и другими ранними вирусными белками.

#### Карта расщепления аденовирусных геномов рестрикционными эндонуклеазами и набор вирусных полипептидов

Почти все серотипы аденовирусов имеют уникальные наборы фрагментов ДНК после ее расщепления разными рестрикционными эндонуклеазами. При этом оказалось возможным сгруппировать родственные вирусы по некоторым общим фрагментам ДНК [319]. Фермент *SmaI* был использован для сравнения вирусных геномов из группы В (гл. 24). Для них выявлены важные черты сходства, что очень полезно при классификации изолятов аденовирусов из клинических образцов. Критерием для классификации служит также размер полипептидов аденовирусов по данным электрофореза в ДСН-полиакриламидных гелях [319], причем наиболее полезным оказалось сравнение подвижности и размеров белков гексона, основания пентона, фибриллы, белка сердцевин V. На основе этих данных были предприняты попытки реконструировать путь эволюции от прародителя аденовирусов к различным серотипам.

Тогда как электрофоретическая подвижность структурных вирусных полипептидов и характер гидролиза ДНК рестрикционными эндонуклеазами обеспечивают широкий генотипический анализ любого серотипа, гемагглютинация определяется лишь одним участком ДНК, кодирующим белок фибриллы. Поэтому неудивительно, что при торможении гемагглютинации между серотипами, имеющими весьма различные рестрикционные карты, регистрируются перекрестные реакции. Вместе с тем вирусы со многими идентичными сайтами рестрикции могут различаться в участке, кодирующем белок фибрилл, и не давать перекрестов в реакции торможения гемагглютинации с гиперим-

мунными сыворотками [57]. Очевидно, что для современной классификации новых изолятов аденовирусов должны быть использованы и серологические, и биохимические методы.

## Цикл репликации

Большинство опытов по изучению биохимии аденовирусной инфекции проводили при высокой множественности заражения (от 10 до 200 БОЕ/клетка), чтобы обеспечить синхронизацию инфекции и последующих биохимических событий в процессе репликации. В опытах по изучению биохимии литической инфекции использовали клетки HeLa и KB, в суспензионных культурах которых хорошо растет большинство аденовирусов. Новообразованные аденовирусы остаются ассоциированными с клетками, и это позволяет концентрировать большие массы вируса простым осаждением зараженных клеток в низкоскоростной центрифуге [104].

Цикл репликации аденовирусов разделяют на раннюю и позднюю фазы: последняя, по определению, начинается с момента запуска репликации ДНК. «Ранний» и «поздний» — удобные термины для многих этапов репликации, описываемых далее, однако их не следует понимать слишком буквально. Для некоторых процессов функциональные различия несколько размыты. Многие ранние мРНК синтезируются и во время поздней фазы инфекции, некоторые мРНК (например, для ДНК-связывающего белка) претерпевают изменения в лидерных последовательностях при переходе от ранней к поздней фазе инфекции, в то время как другие остаются неизменными [46]. Недавно было установлено, что основной поздний промотор в малых количествах транскрибируется во время ранней фазы инфекции, но при этом не происходит полной элонгации конечного первичного транскрипта до правого конца вирусной ДНК [47, 171].

Структурные белки аденовирусов синтезируются в основном в поздней фазе. Однако полипептиды IVa2 и IX, которые являются структурными компонентами, присутствующими в значительных количествах, синтезируются и в ранней фазе. Полипептиды IVa2 и IX транскрибируются с промоторов, отличающихся от промотора всех других поздних структурных белков. Первичные транскрипты ранней области 3 имеют свой уникальный промотор [49], однако в поздней фазе последовательности области 3 могут транскрибироваться с позднего промотора [44, 46, 49].

Аденовирусная инфекция оказывает глубокое воздействие на синтез макромолекул в клетках хозяина. В суспензионной культуре большинство серотипов аденовирусов ингибирует синтез



клеточных ДНК и белков [95, 120, 236]. В некоторых монослойных культурах, зараженных Ad12, на ранних стадиях инфекции наблюдали стимуляцию синтеза хозяйской ДНК, что может быть связано со способностью этого вируса трансформировать клетки [269]. Не исключено, что ингибирование синтеза хозяйских белков частично обусловлено вытеснением клеточных мРНК из поздних цитоплазматических полисом [180]. Однако первичная транскрипция клеточных последовательностей остается активной в ядре, где хозяйские РНК составляют до 80—90% ядерных транскриптов [200, 240]. Транспорт предшественников клеточных мРНК в цитоплазму нарушается [9, 15]. Быстрое выключение синтеза хозяйских белков вряд ли объясняется ингибированием транспорта или процессинга ядерных транскриптов, поскольку быстрого разрушения клеточных мРНК на полисомах не происходит. Полученные данные позволяют предположить существование какого-то механизма регуляции трансляции. Несмотря на то что синтез предшественника 45S-рРНК продолжается, при аденовирусной инфекции практически полностью ингибируется образование новых рибосом, что напоминает процесс, происходящий при применении ингибиторов синтеза белков [244].

Синтез клеточной ДНК постепенно ингибируется после того, как начинается синтез вирусной ДНК, через 6—9 ч после заражения [128]. Механизм выключения синтеза клеточной ДНК не до конца ясен. Согласно одной из гипотез, для продолжения синтеза хроматиновой ДНК необходимо продолжение синтеза клеточных белков, в том числе гистонов. Таким образом, выключение синтеза клеточной ДНК может быть вторичным по отношению к выключению синтеза клеточных белков. Альтернативная гипотеза основана на серии следующих опытов. Если синтез вирусной ДНК начинался во время фазы G1 клеточного цикла, то синтеза хозяйской ДНК в следующей фазе S не наблюдали. Однако если синтез вирусной ДНК в синхронизированных клетках совпадал с фазой S клеточного цикла, то уровень синтеза хозяйской ДНК не менялся на протяжении многих часов [120]. Из этих опытов был сделан вывод, что при аденовирусной инфекции ингибируется инициация синтеза клеточной ДНК, а не его продолжение. Поскольку каждый хозяйский репликон синтезируется примерно в течение 30 мин, действие вируса осуществляется не на уровне индивидуальных репликонов.

Литический цикл аденовирусов группы C (Ad2 и Ad5) очень эффективен: синтезируется примерно 10 000 вирионов на зараженную клетку [103]. Таким образом, в течение одного вирусного цикла (32—36 ч) общее содержание ДНК и белка в клетке удваивается. Увеличение происходит практически только за счет вирусных макромолекул. Весьма незначительная часть клеток (около 15%), зараженных вирусом с высокой множественностью,

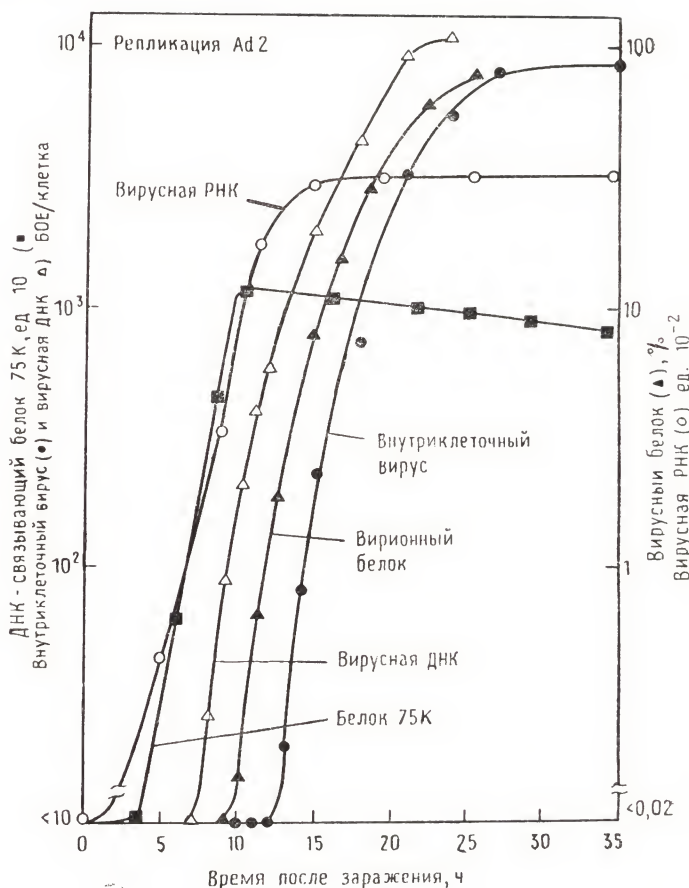


Рис. 28.4. Кинетика синтеза вируса и вирусных макромолекул. Представлены цикл инфекции Ad2 и кинетика синтеза типичных макромолекул. ДНК-связывающий белок 75К — пример ранних вирусных белков. (С любезного разрешения Marcel Dekker Inc. из [336a].)

делится [123]. На рис. 28.4 представлена примерная скорость синтеза вирусных макромолекул при  $37^\circ\text{C}$  для аденовирусов группы С. Цикл для вирусов группы А несколько длиннее.

### Прикрепление, проникновение, раздевание

Поскольку большинство частиц исходного вируса неинфекционны, изучение ранних событий при взаимодействии аденовируса с клеткой столь же сложно, как и при других вирусных

инфекциях эукариотических клеток. Соотношение числа частиц к числу БОЕ варьирует от 11 : 1 до 2300 : 1 для различных серотипов [105]. Эти цифры позволяют предположить, что многие частицы, видимые в электронном микроскопе или определяемые по распределению радиоактивной метки в различных клеточных структурах, не относятся к тому меньшинству вирусных частиц, которое обладает инфекционностью. Тем не менее проведено много интересных опытов, из которых следует, что фибрилла вируса прикрепляется к специфическим рецепторам на клеточной мембране [184]. По ингибированию фокусов флуоресценции [232], но не по подавлению бляшек [231] антитела к фибрилле нейтрализуют вирусную инфекцию. Из мембран клеток КВ с помощью аффинной хроматографии очищен рецепторный комплекс, содержащий по крайней мере три полипептида [117]. В качестве лигандов использовали пришитые белки основания пентона и фибриллы (капсомеры пентона), ориентированные таким образом, что конец фибриллы оставался свободным. Растворимый и частично очищенный рецептор, содержащий полипептиды 78К, 42К и 34К, подавляет присоединение вируса к клеткам КВ. Согласно ряду данных, присутствующие в фибрилле и в рецепторе углеводные участки не принимают участия во взаимодействии фибриллы с клеточным рецептором. Образование диимидозфирной связи, сшивающей аминокруппы, позволяет предположить, что в реакции принимают участие аминокислоты [117]. Вирус входит в клетку, по-видимому, путем прямого проникновения и на этом этапе теряет капсомеры пентона [205, 232]. На клетку приходится примерно  $10^4$  рецепторов для вирионов и  $10^5$  рецепторов для фибриллы, что позволяет предположить мультивалентное связывание вируса с клеточной мембраной. Некоторые электронные микрофотографии дают основание считать, что аденовирус проникает в клетку по механизму пиноцитоза и при этом теряет лишь часть пентонов (20%) на мембране [41, 42]. Однако вирионная ДНК быстро становится чувствительной к ДНКазе, ее плавающая плотность увеличивается (что указывает на потери белка), а вирусный гемагглютинин утрачивается [285]. Перенос вирионов через цитоплазму происходит, по-видимому, при участии микротрубочек [53, 188]. В исследованиях *in vitro* показано сродство микротрубочек к гексоновым капсомерам аденовирусов. Интересно, что некоторые антитела к белкам гексона нейтрализовали инфекционность вирионов так же, как и антитела к фибрилле. Возможно, что перипентоновые гексоны важны для проникновения через клеточную мембрану; не исключено также, что взаимодействие гексон — микротрубочки нарушается типоспецифическими гексоновыми антителами. Вещества, взаимодействующие с микротрубочками, по-разному влияют на аденовирусную инфекцию. Колихцин не влияет на аденовирус-



ный цикл репродукции, а винбластин ингибирует вирусную репликацию [53]. Винбластин вызывает образование больших перинуклеарных паракристаллов тубулина, которые связывают аденовирусы и препятствуют переходу частиц, потерявших пентон, к следующей стадии раздевания в ядре. Когда вирус доходит до ядра, ДНК проникает в ядро, а большинство вирионных белков остается в цитоплазме [232]. Полностью этот процесс занимает около 2 ч при 37°C; он нуждается в энергии АТФ и при 0°C не происходит [43]. Вирусная ДНК, вероятно, не может существовать в клетке в полностью депротеинизованном состоянии. Вирусная сердцевина (ДНК плюс вирусные полипептиды V, VII, TP и  $\mu$ ) превращается в комплекс вирусная ДНК — клеточные гистоны, который, судя по действию на него ДНКазы в низких концентрациях, напоминает хроматин [295]. До сих пор неясно, вся ли проникающая вирусная ДНК образует комплексы с клеточными гистонами или только та ее часть, которая интегрирует с хромосомой в процессе литической инфекции [316].

### Ранняя транскрипция

Ранняя транскрипция аденовирусов — сложная серия взаимосвязанных биохимических событий; ее можно определить как синтез вирусных РНК на проникшей в клетку аденовирусной ДНК-матрице до начала репликации вирусной ДНК. Ранние вирусные мРНК составляют менее 0,1% общей клеточной РНК. Однако вирусной ДНК [180, 300] комплементарны 5—18% полисомной мРНК. Ранние транскрипты считываются с обеих цепей ДНК, что стало ясно из данных по разделению цепей с помощью синтетического poly(UG). Детальный анализ транскрипции разных областей аденовирусного генома стал возможен благодаря использованию рестрикционных эндонуклеаз. Сначала считали, что ранние цитоплазматические мРНК комплементарны четырем отдельным областям вирусной ДНК [264]. Впоследствии это число возросло до семи областей, начинающихся с шести промоторов [46, 283, 334] (рис. 28.5). Организация геномов одинакова для аденовирусов всех групп, и положение генов, кодирующих определенные функции, одинаково у всех изученных серотипов.

### Методики картирования транскриптов

Многие первичные транскрипты и зрелые мРНК точно картированы с помощью гетеродуплексного анализа на электронном микроскопе. Проводили также гибридизацию между вирус-специфическими цитоплазматическими мРНК или ядерными транскриптами и денатурированными цепями всего генома или отдельных рестрикционных фрагментов [45]. Именно при исполь-

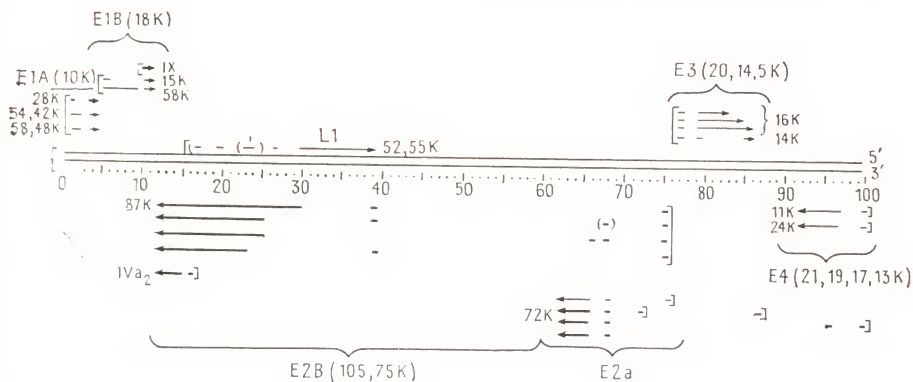


Рис. 28.5. Генетическая карта ранних белков, кодируемых Ad2, и их мРНК. Тонкие линии — мРНК, которые могут быть обнаружены на ранней стадии в отсутствие синтеза белков. Толстые линии соответствуют промежуточным мРНК. Эти мРНК экспрессируются в отсутствие репликации вирусной ДНК, т. е. на ранней стадии, но на поздней стадии их больше. Стрелки указывают на 3'-конец. Предполагаемые промоторные участки обозначены  $\Delta$ . Белок, кодируемый ранней мРНК, представлен рядом с этой мРНК. Обозначения белков, кодируемых определенной ранней областью, для которой структура мРНК еще не определена, даны в скобках. (С разрешения из [229].)

зовании этого метода для анализа поздних аденовирусных транскриптов был открыт сплайсинг [16, 48]. С помощью гетеродуплексного анализа можно определить места соединений при сплайсинге, а также длину интронов. Для картирования использовали и биохимические методы. Например, проводили отжиг смеси денатурированной радиоактивно меченной аденовирусной ДНК и немеченых ранних мРНК. Гетеродуплексы (рис. 28.6) обрабатывали нуклеазой S1, гидролизующей любые одноцепочечные участки ДНК, или экзонуклеазой VII [17], гидролизующей только одноцепочечные свободные концы ДНК, и о длине интронов и экзонов судили по подвижности образующихся фрагментов ДНК при электрофорезе в щелочных условиях.

#### Геномная локализация ранних транскриптов аденовирусов

Опыты по ультрафиолетовому картированию четко показали, что большинство ранних областей имеют собственные промоторы [18, 107а, 334], тогда как раньше считали, что ранние транскрипты аденовирусов являются продуктами нарезания единого транскрипта. УФ-инактивация максимальна для наиболее удаленных от промотора транскриптов, т. к. повреждения ДНК кумулятивны. Однако после УФ-облучения ЕЗ-мРНК (которая должна была бы находиться на 3'-конец единого транскрипта) не отличалась по эффективности синтеза от других

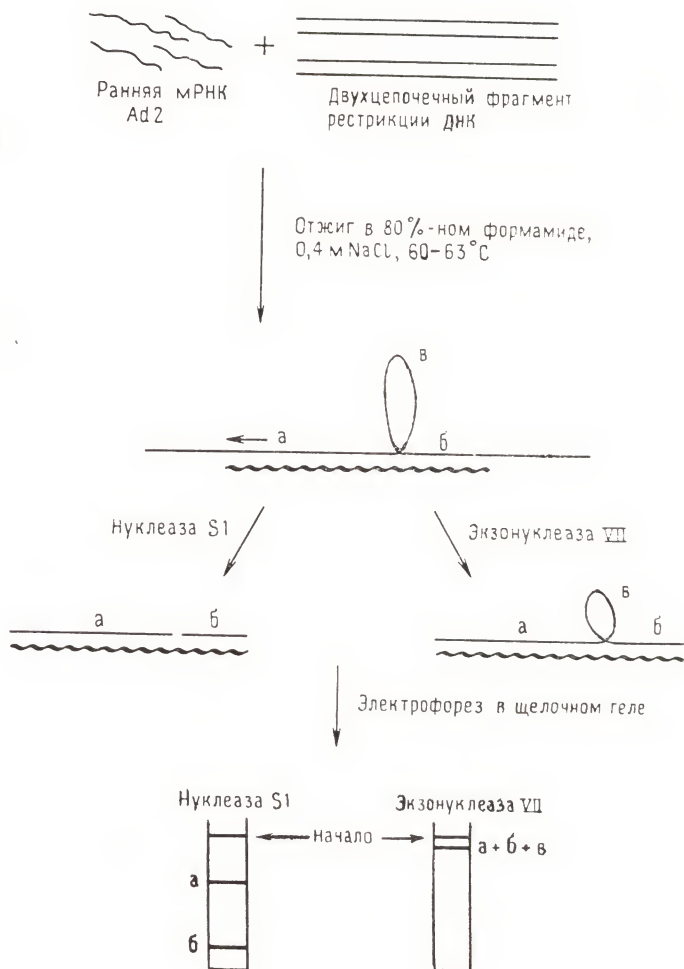


Рис. 28.6. Схема биохимического эксперимента, поставленного с целью обнаружения сайтов сплайсинга. Гибриды, образующиеся между ранней мРНК и  $^{32}\text{P}$ -рестрикционными фрагментами ДНК Ad2, гидролизуют или S1-нуклеазой, или экзонуклеазой VII. Продукты анализируют электрофорезом в щелочном геле. Эта методика была разработана Берком и Шарпом [17]. (С разрешения из [302a].)

мРНК. Более поздние эксперименты по определению размеров и этапов процессинга ранних транскриптов подтвердили существование нескольких ранних промоторов.

Последние данные позволили значительно расширить представления о четырех основных ранних транскриптах и выделить



«непосредственно ранний» (*L1*), «предранний» (*E1A*), «задержанный ранний» (*E1B-E4*) и «промежуточный» (*IVa2, IX*) транскрипты (рис. 28.5). *L1* обозначен в соответствии с номенклатурой, принятой для поздних (*L*) генов, поскольку он впервые обнаружен как поздний транскрипт и синтезируется в поздней фазе в значительно больших количествах, чем в качестве непосредственно раннего транскрипта (см. ниже). Прежде всего мы остановимся на классических ранних участках, а также ставшем недавно известным транскрипте *2B*, который в некоторых публикациях обозначают как область *V*. Ген, кодирующий ДНК-связывающий белок и обозначавшийся ранее как область *2*, теперь обозначают как область *2A*. Более подробно все новые транскрипты, синтезирующиеся до начала репликации вирусной ДНК, будут рассмотрены в разделе «Регуляция экспрессии ранних генов аденовирусов». Цепь, транскрибируемая слева направо (*r*), содержит участки *E1* и *E3* от 1,3 до 11,2 и от 76,6 до 86,2 ед. карты соответственно. Домен *E1*, который разделяют на *E1A* (от 1,3 до 4,5 ед. карты) и *E1B* (от 4,6 до 11,2 ед. карты), представляет особый интерес, так как он кодирует трансформирующие функции аденовирусов [260]. *E1A* может трансформировать клетки и в отсутствие *E1B*, но происходящая при этом трансформация характерна только для клеток перевиваемых линий, но не для первичных культур [308]. Вероятно, именно *E1B* ответствен за трансформацию, однако на этот вопрос пока трудно ответить однозначно, поскольку ген *E1A* осуществляет регуляцию всех других ранних аденовирусных генов. Для эффективной транскрипции *E2A*, *E2B*, *E3* и *E4* необходим активный транскрипт *E1A* [171] или, как обсуждается ниже, манипуляции с клетками, позволяющие обойти функцию *E1A* [210]. Регулирующую функцию *E1A* активно исследовали и выделили много мутантов по области *E1A/E1B* [111, 142, 268]. Удалось показать, что продукт гена *E1A* имеет структуру, сходную с онкогенными полипептидами *тус* и *myb* [242].

1-Цепь, считываемая справа налево, кодирует *E4* (от 96,8 до 91,3 ед. карты), *E2A* (от 67,9 до 61,5 ед. карты) и *E2B* (от 29 до 14,2 ед. карты). *E2A* кодирует ДНК-связывающий белок, существенный не только для репликации, но и для модуляции транскрипции, особенно области *E4* [110, 212]. Промотор мРНК *E2A* изменяется при переходе от ранней фазы инфекции к поздней и может начинаться со столь отдаленных позиций, как 87 или 99 ед. карты. Транскрипты *E2B* и *E2A* имеют общие лидерные последовательности и экспрессируются координированно, но количество первого примерно в 100 раз меньше, чем второго [77, 283]. Из-за малых количеств мРНК *E2B* этот очень важный участок, кодирующий 140К-ДНК-полимеразу (от 22,8 до 14,2 ед. карты) [1, 85, 177] и 80К-предшественник концевой белка (от

28,4 до 23,2 ед. карты), долго не удавалось обнаружить [274]. Продукты генов *E2A* и *E2B* и их функции будут подробно обсуждаться в разделе «Синтез ДНК аденовирусов *in vitro*».

#### **Промоторы, кэп-структуры, сплайсинг, присоединение poly(A)**

Ранние и поздние аденовирусные мРНК синтезирует клеточная РНК-полимераза II. Количество ранних мРНК определяется рядом факторов, причем изменение множественности заражения от 1 до 100 БОЕ/клетка оказывает на синтез ранней мРНК значительно меньшее влияние, чем на синтез вирусной ДНК [17, 78]. Роль хозяйской РНК-полимеразы II в синтезе аденовирусных мРНК была доказана в экспериментах с  $\alpha$ -аманитином — специфическим ингибитором данного фермента [240]. Недавно ее основная роль была подтверждена в опытах *in vitro* [193, 326].

Наиболее существенной для эффективной транскрипции *E1A* является последовательность от —28 до —38 ед. карты выше сайта экпирования *E1A* [222, 223]. Эта область содержит последовательность ТАТТТАТА, сходную с последовательностью Гольдберга — Хогнесса. Делеции в ней уменьшают уровень синтеза мРНК *E1A* в 5—10 раз. Основной сайт экпирования *E1A* расположен у нуклеотида 498, который находится на 31 нуклеотид ниже ТАТА-последовательности [11]. В случае делеции в сайте ТАТА возможно использование других сайтов экпирования. Например, нуклеотиды, расположенные на 230, 185 и 165 нуклеотидов выше, чем основной сайт экпирования, могут служить альтернативными, но менее эффективными сайтами экпирования [221]. После начала репликации ДНК обнаруживаются и другие минорные сайты экпирования мРНК *E1A*, которые не функционируют в присутствии цитозинарабинозида — ингибитора синтеза ДНК. Последовательность кэпа *E1A*  $m^7Gppp(m^6)A^mC^{(m)}UCUUG_p$  отличается от последовательности кэпа *E1B*, и не исключено, что для каждой ранней мРНК существует своя последовательность [116]. Обозначение (m) указывает на частичное метилирование.

В настоящее время обнаружено восемь различных кэпов. Среди них один для области *E4* — необычный, начинающийся с  $U^m$ , т. е. с пиримидина вместо пурина [115]. Первый кодон АТГ гена *E1A* расположен в позиции 62—64 по отношению к сайту экпирования, а потенциальный сайт связывания рибосом — между нуклеотидами 22 и 32. Недавние эксперименты с использованием вириона с точечной мутацией на 3'-конце мРНК в сайте нормального расщепления и полиаденилирования *E1A* позволяют предположить, что процессы расщепления и полиаденилирования

разобщены [204a]. Если U в олигонуклеотиде AAUAAA превращали в G, то расщепление в положении 1630 уменьшалось более чем в 10 раз, что приводило к сквозному считыванию *E1B*. Все молекулы, которые были расщеплены, были полиаденилированы. Однако мутант, у которого расщепление произошло в положении 1605, не был полиаденилирован, но был сплайсирован. Таким образом, полиаденилирование не обязательно для сплайсинга. Эти результаты, полученные в опытах с использованием мутантов, приводят к тем же заключениям, что и результаты, полученные с применением кордицепина — аналога аденозина. Транскрипты, лишенные poly(A), в цитоплазме отсутствуют, что, вероятно, обусловлено блокированием их транспорта. Нельзя также полностью исключить предположение, что они достигают цитоплазмы, но затем очень быстро гидролизуются.

#### Регуляция экспрессии ранних генов аденовирусов

Сложный процесс регуляции экспрессии ранних генов аденовирусов активно изучается во многих лабораториях. Согласно современным представлениям, он включает несколько стадий, центральной из которых является экспрессия *E1A*. Участок *E1A*, который также называют предранним, регулирует накопление мРНК *E1B*, *E2*, *E3* и *E4*, но мРНК *E1A* — не первый вирусный транскрипт, появляющийся в зараженных клетках. Многие описанные ниже исследования были проведены с использованием ингибиторов синтеза ДНК или белков. Применение этих ингибиторов открывает широкие возможности в изучении экспрессии вирусных генов.

Известно, что при добавлении к клеткам, зараженным аденовирусом, циклогексимида увеличивается включение радиоактивной метки в ранние РНК, причем показано, что радиоактивность действительно отражает увеличение количества специфических мРНК [52]. Влияние, оказываемое циклогексимидом на синтез ранних мРНК, позволяет предположить, что в норме существует клеточный репрессор, ингибирующий экспрессию ранних генов [32, 65]. В процессе изучения этого белка-репрессора было исследовано большое число мутантов, имеющих изменения в области *E1A* [19, 142]. При изучении этих мутантов были представлены убедительные доказательства того, что *E1A* действительно регулирует экспрессию *E1B*, *E2A*, *E3* и *E4*. Поскольку существовало предположение, что регуляция экспрессии других ранних генов происходит с помощью полипептида — продукта гена *E1A*, усиление транскрипции под действием циклогексимида выглядело парадоксальным. Чтобы прояснить ситуа-



цию, был поставлен ряд опытов. Поскольку циклогексимид ингибирует синтез белков не более чем на 97%, был использован анизомицин (100 мкМ), ингибирующий на 99,6%. При этом исходили из того, что остаточный уровень синтеза обеспечивает продукцию небольшого количества каталитического полипептида [171]. Оказалось, что анизомицин подавляет синтез всех известных мРНК, в том числе мРНК E1A. Тем не менее обнаружено два новых вида мРНК — РНК для белка 13,5К, кодируемого участком между 17,0 и 21,5 ед. карты, и L1-мРНК для позднего белка 52К—55К, кодируемого между 29 и 34 ед. карты (рис. 28.5) [1]. Раньше считали, что это районы исключительно поздних транскриптов. Транскрипты *L1* содержат поздний, состоящий из трех частей лидер (16,4; 19,6 и 26,6 ед. карты); некоторые из них содержат еще и лидер *i* (от 21,5 до 23,0 ед. карты) (см. ниже раздел «Поздняя транскрипция»). Эти две области, обозначенные как «непосредственно ранние», не зависят от функции *E1A*, поскольку их обнаруживают после заражения клеток делеционным мутантом по *E1A* dl 312. Из пяти групп поздних транскриптов *L1* расположен ближе всего к трем лидерным участкам. Никакие другие поздние транскрипты во время ранней фазы инфекции не обнаружены. При уменьшении концентрации анизомицина или сдвиге момента его внесения от 30 мин до заражения на разные сроки после него наблюдали последовательное появление других транскриптов. Синтез *E1A* был менее подавлен, чем синтез других транскриптов, и его обозначают как «предданный». Синтез «задержанных ранних» транскриптов зависит от продуктов *E1A*. Согласно данным других авторов, области *E2* и *E3* более чувствительны к действию анизомицина, чем области *E1A* или *E4* [267]. Наиболее чувствительными к действию ингибиторов синтеза белка оказались гены, классифицированные как «промежуточные». Два из них кодируют полипептиды IX и IVa<sub>2</sub> (9,8—11,2 и 16,1—11,1 ед. карты соответственно). Синтез белков IX и IVa<sub>2</sub> начинается на ранней стадии инфекции и ускоряется на поздней. Среди непосредственно ранних генов *L1* весьма устойчив к действию анизомицина (500 мкМ), тогда как ген 13,5К-белка более чувствителен и при концентрации 500 мкМ анизомицина ингибируется. Уровни экспрессии гена *L1* и других ранних генов на ранней стадии инфекции соизмеримы, однако на поздней стадии уровень экспрессии *L1* значительно увеличивается. Обнаружение ранней экспрессии позднего гена *L1* крайне удивило исследователей. Вместе с тем с помощью этого явления можно попытаться объяснить аномальные явления, обнаруживаемые в аденовирусных системах транскрипции *in vitro*. Эти системы (более подробно см. разд. «Поздняя транскрипция») работают при использовании экстрактов незараженных клеток, в которые добавлена РНК-полимераза II [193, 326]. Ранее счи-

тали, что *in vivo* поздние транскрипты не экспрессируются до тех пор, пока не накопятся некоторые продукты ранних генов. Поэтому ожидали, что *in vitro* необходимы продукты вирусных генов. Новые данные о том, что *L1* экспрессируется как непосредственно ранний ген, позволяют обойтись без постулирования таких продуктов. Поскольку поздние области *L4* и *L5* никогда не экспрессируются на ранней стадии инфекции, а минимальная экспрессия *L2* и *L3* может быть артефактом или результатом случайного считывания, был предпринят поиск (в районе 39 ед. карты) факторов, регулирующих терминацию или ограничивающих элонгацию поздних аденовирусных мРНК в ранней фазе инфекции.

Представление о последовательной экспрессии ранних транскриптов и ее модуляции под действием ингибиторов синтеза белка привело к предположению о существовании факторов, позитивно и негативно влияющих на транскрипцию аденовирусов. Была проведена большая серия опытов, основанных на концепции о существовании клеточного репрессора, который препятствует транскрипции областей *E1B-E4* [209]. Функция белка *E1A* в этом случае заключается либо в связывании с репрессором, либо в ингибировании синтеза последнего. Циклогексимид также может подавлять синтез репрессора. Результаты исследований с мутантами, например *dl 312* с делецией в гене *E1A*, согласуются с данной гипотезой, но не доказывают ее. Делеционные мутанты по *E1A*, такие, как *dl 312*, могут размножаться в трансформированных клетках линии 293, происходящих из почек эмбриона человека. Геномы этих клеток содержат стабильную вставку левого конца генома аденовирусов и экспрессируют транскрипты *E1A* и *E1B*. При низкой множественности заражения клеток HeLa мутантом *dl 312* экспрессии ранних генов *E1A-E4* не наблюдается. При высокой множественности заражения экспрессируются области *E1B-E4*, а экспрессия гена *E1A* остается на низком уровне, но при этом происходит нормальная продукция вируса. Возможно, что при высокой множественности заражения *E1A* продуцирует достаточное количество функционального белка, который инактивирует постулируемый клеточный репрессор.

Показано, что возможны и другие способы активации области *E1B-E4* без участия функционально активного гена *E1A*, например при изучении клеток HeLa, зараженных одновременно мутантом *dl 312* и *ts*-мутантом по непосредственно раннему гену вируса псевдобешенства (герпесвируса) [75]. Вирус псевдобешенства выбран потому, что он на ранней стадии включает синтез клеточных белков, а *ts*-мутант вируса псевдобешенства G1 не ингибирует этот синтез. ДНК-связывающий белок (DBP) представляет собой продукт раннего гена аденовирусов, который исполь-

зовали в качестве индикатора синтеза аденовирусных белков. Он экспрессируется при перmissive температуре в коинфицированных клетках. Комплементационная функция вируса псевдобешенства была температурочувствительной, что и следовало ожидать, исходя из характера мутации G1. Поскольку не должно быть гомологии между *tsG1*-белком вируса псевдобешенства и аденовирусным белком E1A, логично предположить, что общие функции связаны с хозяйским белком. Это предположение подтверждает активация клеточных генов под действием продукта гена *E1A*. Синтез хозяйского белка 70K индуцируется диким типом аденовируса, но его не обнаруживают в клетках HeLa, зараженных мутантом *dl 312*. Белок 70K постоянно синтезируется в клетках 293, в которых экспрессия гена *E1A* также постоянна. Индукция синтеза 70K наблюдается в клетках после теплового шока (43°C) [210]. На основании полученных данных предположили, что: а) клеточный регуляторный элемент подавляется продуктом гена *E1A* Ad2 или тепловым шоком в незараженных клетках или б) *E1A* непосредственно активирует 70K-белок. Эти привлекательные представления, особенно если учесть, что участок *E1A/E1B* играет важную роль в трансформации клеток, открывают новые экспериментальные подходы для изучения специфических функций хозяина, изменяющихся в процессе трансформации вирусами.

Среди ранних вирусных генов выявлены и другие регуляторные функции. DBP-продукт гена *E2A*, вероятно, подавляет инициацию транскрипции области *E4* через 6 ч после заражения аденовирусом. В отличие от того что имело место при заражении диким типом, при заражении клеток HeLa при неперmissive температуре *H5 ts125*-мутантом по DBP выключения транскрипции *E4* не наблюдалось [8, 212]. При этом, как обычно, происходило сначала усиление, а затем ослабление синтеза мРНК *E2A*. По-видимому, в этих опытах эффектором служит *ts* DBP, а не изменение уровня синтеза его мРНК. DBP регулирует также стабильность, но не синтез *E1A* и *E1B*-мРНК. При заражении *H5 ts125* эти мРНК в 3—5 раз стабильнее при неперmissive температуре, чем при перmissive [32].

Синтез ДНК завершает раннюю фазу цикла репликации вируса. Механизм переключения с ранней на позднюю транскрипцию до сих пор неясен. При смешанном последовательном заражении клеток двумя различными серотипами аденовируса, продукты транскрипции которых можно различить, было показано, что механизм переключения представляет собой цис-функцию вирусной ДНК [298]. В отличие от первого введенного генома второй не давал продукции поздних мРНК. Таким образом, в процессе репликации ДНК в геноме происходят некоторые изменения, позволяющие начать позднюю транскрипцию. Одна-



ко никаких изменений в метилировании, ковалентном связывании концевых белков, распределении нуклеосом или перераспределении генома во внутриядерном пространстве не обнаружено. Насколько важно в этом процессе присутствие ДНК в одноцепочечной форме, пока неясно.

### Ранние белки

В последние годы значительный успех в понимании функций ранних белков аденовирусов был достигнут благодаря применению систем синтеза их ДНК *in vitro* и изучению трансформации клеток ее фрагментами. В настоящее время определены некоторые функции трех ранних аденовирусных полипептидов, которые принимают участие в репликации ДНК и кодируются областями *E2A* и *E2B* [298]. Полипептиды, связанные с аденовирусной трансформацией, идентифицированы; они кодируются генами *E1A* и *E1B*. Однако еще мало что известно о более чем десяти других полипептидах, кодируемых генами *E1A*, *E1B*, *E3* и *E4*. Для определения ранних аденовирусных полипептидов используют электрофорез в полиакриламидном геле, гибридселективную трансляцию, иммунологические и другие методы.

Уже давно известно, что сыворотки хомячков, несущих опухоли, индуцированные аденовирусами, реагируют с клетками культур тканей, зараженными аденовирусами [135, 238, 255, 261, 309], причем эти клетки проявляют иммунореактивность еще до начала репликации вирусной ДНК [93]. Ранние антигены получили название Т-антигенов из-за их предполагаемой связи с опухолями, индуцированными аденовирусами. Показано, что сыворотки хомячков, несущих опухоли, осаждают большую группу Т-антигенов, что отличает аденовирусы от SV40, у которого имеются только большой и малый Т-антигены. Домен аденовирусной ДНК, ответственный за трансформацию, локализован в левой части (0—12%) вирусного генома, однако в некоторых трансформированных клетках стабильно интегрирована значительно большая часть генома [101]. Сыворотки животных, несущих опухоли, индуцированные такими клетками, осаждали ДНК-связывающий белок (DBP) [93]. DBP, продуцируемый некоторыми линиями трансформированных клеток, картируется на участке 62—66%, т. е. весьма далеко от трансформирующего участка [169]. Поскольку имеется много других ранних аденовирусных белков, следует пересмотреть обозначение аденовирусных Т-антигенов; Т-антигенами должны называться только продукты участков *E1A* и *E1B*.

Некоторые ранние полипептиды идентифицированы с помощью <sup>35</sup>S-метионина, последующей иммунопреципитации сыворотками хомячков с опухолями, индуцированными аденовирусами, и определения их электрофоретической подвижности в

ДСН-полиакриламидном геле [112, 321]. Однако при этом трудно различить вирусные и хозяйские белки, поскольку синтез последних не подавлен в ранней фазе инфекции. Эту трудность удалось преодолеть с помощью системы трансляции *in vitro*, которая позволила различить вирусные и хозяйские транскрипты, а также картировать гены полипептидов в аденовирусном геноме. Отбор аденовирусных мРНК с помощью рестрикционных фрагментов ДНК оказался чувствительным методом картирования, с помощью которого удалось идентифицировать более 15 ранних вирусных полипептидов [112, 174]. Сравнительно нетрудно картировать полипептид в геноме, гораздо сложнее установить, какой из полипептидов, кодируемых одним участком генома, наиболее важен для генетических функций, картируемых в этом участке (рис. 28.5). Например, выявлено много полипептидов с мол. массами 38—55K, гены которых картируются в *E1A*, и три полипептида, считываемые с участка *E1B*. Новые методы, такие, как сайт-специфический мутагенез клонированных ДНК, позволили вводить мутации в критические участки гена, чтобы определить роль каждого из полипептидов, кодируемых одним и тем же участком [204]. С помощью мутагенеза, направленного на экзон 13S-мРНК, который одновременно является интроном 12S-мРНК, стало возможным различить функции 12S- и 13S-мРНК, гены которых перекрываются на участке *E1A*. Термины «интрон» и «экзон» трудно использовать для многих участков аденовирусной ДНК, поскольку одни и те же участки генома могут быть и интронами, и экзонами для различных мРНК, считываемых с одной и той же области ДНК. Другая сложность терминологии — это обозначение полипептидов по их молекулярным массам, которые могут несколько различаться по данным разных лабораторий [198]. Эта проблема обусловлена вариациями условий электрофореза, а также использованием разных маркерных белков.

Изучение функций полипептидов, кодируемых *E3*, осложняется тем, что область *E3* несущественна для размножения аденовирусов в культуре ткани. Делеции в этом районе не влияют на репликацию вируса. Геном аденовируса может рекомбинировать с фрагментами ДНК SV40 и давать стабильные недефектные гибриды Ad—SV40, в которых вставка ДНК SV40 расположена в области *E3* [170]. Однако гликопротеин 19K, кодируемый *E3*, связывается с основным комплексом гистосовместимости грызунов (H2) или человека (HLA), и это позволяет проводить функциональный анализ в системах, где можно измерять опосредованную Т-клетками цитотоксичность, зависящую от поверхностных антигенов вируса [160]. Об участке *E4* информация скудна. Известно лишь, что делеции, устраняющие полипептид 11K, кодируемый участком *E4*, не влияют на урожай вируса [262].

Область *E1*

Несомненно, что область *E1* является критической для аденовирусной трансформации [101, 308]. Хотя *ts*-мутации в областях *E2A* и *E2B* влияют на эффективность трансформации, вызываемой *E1* [97, 183, 333], для сохранения трансформированного фенотипа необходим только участок *E1*. Для полной трансформации нужны оба домена *E1* (*E1A* и *E1B*). До конца неясно, необходим ли *E1A* только для включения синтеза полипептида *E1B* или его влияние более прямое. Клетки, трансформированные только последовательностью *E1A*, не обладают некоторыми свойствами полностью трансформированных клеток. Они становятся перевивающимися клеточными линиями, но не растут в полужидком агаре и синтезируют не все Т-антигены (например, не синтезируют антигены, кодируемые *E1B*). Эти частично трансформированные клетки растут медленнее клеток, трансформированных вирусом или вирусной ДНК, содержащей и *E1A*, и *E1B*. Область *E1A*, локализованная между 1,3 и 4,5 ед. карты, кодирует *in vivo* шесть полипептидов от 38 до 51К, которые считываются с двух мРНК. Два из них — кислые полипептиды 51К и 48К — синтезируются на более длинной и более короткой мРНК соответственно [249]. Полипептид 51К двух мутантов по кругу хозяев *H5hr1* и *H5hr2* синтезируется в укороченной форме, 28К, тогда как их полипептид 48К синтезируется нормально. Это происходит из-за мутации в интроне 48К-мРНК, приводящей к сдвигу рамки считывания в 51К-мРНК. Аналогичные результаты были получены при замене Т на Г в третьем положении триплетта в интроне 12S-мРНК, которая не приводила к изменениям в белке, кодируемом 13S-мРНК [204]. Эти точечные мутанты при заражении клеток с высокой множественностью (800 БОЕ/кл) дают нормальный урожай вируса (такой, как у вируса дикого типа). Как обсуждалось ранее, по-видимому, какие-то клеточные факторы позволяют компенсировать дефект гена *E1A* [209].

Вирионы Ad12 и Ad5 могут трансформировать клетки культуры ткани, но их онкогенный потенциал для животных сильно различается. Недавно удалось выявить функциональные различия между областями *E1A* высокоонкогенного Ad12 и неонкогенного Ad5 [20, 263]. При трансфекции изолированным *E1A*-фрагментом Ad12 или Ad5 в присутствии активного гена *E1B* показано, что синтез основного полипептида гистосовместимости I класса (H2 или HLA) включает только *E1A* Ad12. При этом H2-мРНК не синтезируется, т. е. подавление образования H2 осуществляется на уровне транскрипции.

Участок *E1B*, располагающийся между 4,6 и 11,2 ед. карты, кодирует три полипептида — 19К, 20К и 53К. Белки 20К и 53К имеют общие пептиды триптического гидролизата, но белок



19К уникален по этому признаку и транслируется в другой рамке считывания [198]. Полипептид 19К обнаруживали среди белков шести линий клеток, трансформированных Ad2, в то время как 20К- и 53К-полипептиды не обнаруживали в некоторых из этих линий. Важная роль 19К-полипептида была доказана в экспериментах по комплементации с мутантами Ad5 по участку *E1B*: *dl313* и *dl434* [155a]. Плазмиды, которая содержала последовательность левой части *E1B*, кодирующую 5'-конец мРНК и связанную с геном тимидинкиназы HSV, компенсировала дефект этих мутантов в отсутствие большего полипептида *E1B*.

Большой полипептид *E1B* (58К по номенклатуре Сарноу и соавторов) связывается с клеточным белком 54К, количество которого увеличивается во многих клетках, трансформированных разными опухолеродными ДНК-содержащими вирусами [261]. Так, в клетках, трансформированных SV40, клеточный белок 54К связывается с большим Т-антигеном SV40, что указывает на возможное участие 54К-белка в трансформации. Моноклональные антитела против Т-антигена Ad5 *E1B*-58К иммунопреципитировали клеточный 54К-белок в комплексе с 58К, но не реагировали со свободным 54К. Функциональное значение клеточного белка 54К пока не известно.

### Область *E2*

*E2* кодирует белок DBP, связывающийся с одноцепочечной ДНК, а также с концами двухцепочечной ДНК [181]. DBP синтезируется в больших количествах в клетках, зараженных аденовирусами. По данным электрофореза в полиакриламидном геле мол. масса DBP составляет 72К, однако по данным секвенирования открытой рамки считывания участка 2A Ad2 и Ad5 его мол. масса составляет 58К [157, 158]. Препараты этого белка в ранних работах содержали протеолитический фрагмент 44К, который образуется в результате ограниченного гидролиза полипептида 72К химотрипсином [5, 150, 310]. Дальнейшее протеолитическое расщепление приводит к образованию фрагмента 34К, который так же, как и фрагмент 44К, представляет собой С-конец полного DBP [84]. *In vivo* DBP интенсивно фосфорилирован, но очищенный фрагмент 34К практически не содержит фосфатных остатков [84, 150]. По-видимому, все фосфатные остатки сгруппированы на N-конце. Известны *ts*-мутанты (*H5 ts125* и *H5 ts107*) с одинаковой заменой одной аминокислоты в С-концевом участке [159]. Мутанты *H5 ts125* и *H5 ts107* выделены независимо, но содержат совершенно идентичный дефект в полипептиде. Были изолированы *ts*<sup>+</sup>-псевдоревертанты *H5 ts107*, причем у ряда их независимых изолятов замены также сгруппированы на очень маленьком участке [159, 213]. DBP необходим

для репликации ДНК *in vivo* и *in vitro* [84, 97, 126, 144, 155, 168, 312]. N-конец DBP не обязателен для репликации ДНК, но в некоторых ситуациях он необходим, так как принимает участие в регуляции транскрипции [5, 84, 155].

Область *E2B* кодирует два полипептида, которые принимают участие в репликации ДНК [1, 85, 177, 274]. Предшественник концевой белка (pTP) синтезируется в виде полипептида 80K, который в процессе сборки вириона превращается в белок 55K, ковалентно связанный с ДНК [38]. Расщепление осуществляется 23K-протеазой, кодируемой на участке 60 ед. карты вирусного генома [29, 322]. С помощью комплементационного анализа в системе синтеза ДНК *in vitro* недавно обнаружена аденовирусная ДНК-полимераза, кодируемая участком *E2B* [85, 177]. Очищенная ДНК-полимераза вируса дикого типа комплементировала дефект *H5ts149* (мутанта, который не способен к репликации ДНК при повышенной температуре). Было показано, что дефект *H5ts149* картируется между 18 и 22 ед. карты. Хотя открытая рамка считывания аденовирусной ДНК-полимеразы предсказывает белок с мол. массой ~120K (22,9—14,2 ед. карты) [1], по данным электрофореза в полиакриламидном геле его мол. масса составляет 140K [176]. Функциональная роль полипептидов *E2A* и *E2B* подробнее обсуждается в разделе «Репликация ДНК аденовирусов».

#### Области *E3* и *E4*

Область *E3* при размножении вируса в культуре ткани не имеет критического значения, однако функции его продуктов существенны для репликации вируса в организме хозяина (человека) [160, 224]. Среди продуктов, кодируемых *E3*, выявлены полипептиды 19K, 14,5K и 14K [165]. Белок 19K — это гликопротеин, который появляется в мембранах зараженных клеток. Согласно ряду данных, gp19K взаимодействует с основными антигенами гистосовместимости клеток грызунов и человека [228a]. Участок *E4* кодирует ряд полипептидов, включая белок 11K, связывающийся с ядерным матриксом [262]. Этот полипептид иммунологически одинаков во всех группах аденовирусов — от А до Е и является единственным примером столь консервативного белка среди всех известных ранних белков аденовирусов. Мутанты со сдвигом рамки считывания не образуют иммунологически распознаваемый белок 11K, однако они нормально размножаются в клетках HeLa и фибробластах W138 человека.

#### Репликация ДНК аденовирусов

Репликацию ДНК аденовирусов активно изучали *in vivo* и *in vitro*. Успешному изучению способствовал ряд особенностей самой ДНК и ее репликации. Во-первых, при репликации адено-

вирусной ДНК в клеточном ядре синтез хозяйской ДНК подавляется более чем на 90% [123, 236], вследствие чего большая часть радиоактивных предшественников включается в вирусную ДНК. Во-вторых, размер ДНК большинства серотипов составляет примерно 36 kb, а мол. масса  $23 \cdot 10^6$ , поэтому с ней легко манипулировать, не вызывая значительных повреждений [106]. В-третьих, удалось создать несколько систем для репликации аденовирусной ДНК *in vitro* [4, 143, 147], включая такую, в которой могут происходить инициация и элонгация синтеза на экзогенных вирусных матрицах [37]. С помощью этих систем удалось очистить и охарактеризовать три продукта вирусных генов и несколько клеточных полипептидов, необходимых для синтеза аденовирусной ДНК. В-четвертых, был получен хороший *ts*-мутант (*H5ts125*), ДНК-фенотип которого проявлялся в опытах *in vitro* и мутантный генный продукт которого использовали для контроля точности репликации ДНК *in vitro* [126, 144, 168, 310, 313]. Среди всех эукариотических хромосомных и вирусных ДНК аденовирусная ДНК уникальна в том смысле, что ее репликация может иницироваться *in vitro*.

#### **Структура аденовирусной ДНК и промежуточных продуктов репликации**

Аденовирусная ДНК представляет собой линейную двухцепочечную молекулу с инвертированной концевой избыточностью примерно в 100 bp для большинства исследованных серотипов [7, 27a, 90, 337]. ДНК, выделенная из вирионов, содержит на каждом 5'-конце по одной молекуле ковалентно связанного концевого 55K-белка (концевого белка, TP) [246, 250]. Концевые инвертированные избыточные последовательности позволяют каждой цепи ДНК образовывать кольцевые структуры, напоминающие «сковороду с ручкой», причем двухцепочечная «ручка» точно повторяет концы исходных двухцепочечных молекул [90, 337] (рис. 28.7). Данные о промежуточных продуктах репликации были получены в исследованиях на культуре клеток. Репликация полуконсервативна [128, 228, 311]. Реплицирующиеся молекулы седиментируют быстрее, чем родительские дуплексы [14, 30, 311]. Однако при денатурации реплицирующихся молекул образуются цепи различной длины вплоть до полноразмерных [123, 307]. Эти данные исключают возможность ковалентного связывания нуклеотидов с родительской молекулой. В более ранних исследованиях не было показано накопление метки во фрагментах Оказаки, что дало основания предложить механизм непрерывной элонгации обеих растущих цепей [123]. Несмотря на непрекращающиеся споры относительно существования фрагментов Оказаки [318, 335], сегодня ясно, что наращивание до-



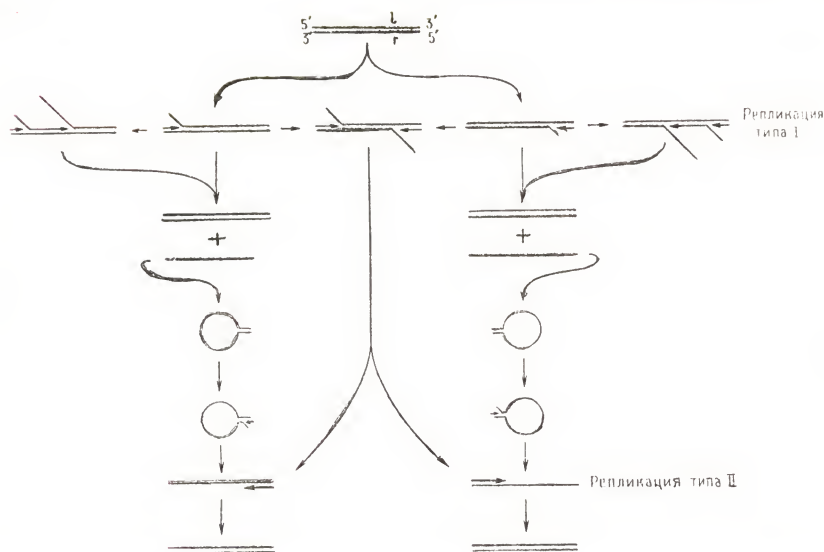


Рис. 28.7. Модель репликации ДНК аденовирусов. Начало репликации аденовирусной ДНК с любого из концов двухцепочечной молекулы, вытеснение одной из родительских цепей и последующая репликация вытесненной цепи описаны в тексте. Репликация типа I относится к синтезу на двухцепочечной матрице, а типа II — к синтезу на одноцепочечной матрице. (С разрешения из [163] © 1977 MIT.)

черной цепи аденовирусной ДНК происходит непрерывно в направлении  $5' \rightarrow 3'$  [227]. Обнаруженные «фрагменты Оказаки», вероятно, были артефактом, вызванным частичным торможением синтеза в неблагоприятных условиях опыта [335].

На основании данных о том, что промежуточные продукты репликации аденовирусной ДНК содержат длинные одноцепочечные ДНК, можно предположить следующий механизм роста цепи: одна из родительских цепей реплицируется, а вторая замещается продвигающейся репликативной вилкой [287, 288] (рис. 28.7). В ранних экспериментах наблюдали не поддававшееся интерпретации преимущество правого конца генома для начала репликации. В дальнейшем, однако, было показано, что участки, ответственные за начало и терминацию репликации, присутствуют на обоих концах молекулы [125, 163, 286, 328]. Анализ полностью реплицированных молекул после короткой инкубации с  $^3\text{H}$ -тимидином показал, что наибольшее количество метки содержится в рестрикционных фрагментах на обоих концах ДНК. Наиболее простая интерпретация этих данных состоит в том, что должна существовать внутренняя точка начала репли-

кации, от которой происходит рост цепи в обоих направлениях. Для реализации такой схемы необходимы фрагменты Оказаки, по крайней мере для синтеза «отстающей» цепи. Это объяснение, однако, противоречит опытам с ДНК гибрида Ad-SV40—Ad2+ND<sub>1</sub> [124]. В гибридной молекуле вставка SV40 располагается возле правого конца. Кинетика включения метки в последовательности SV40, которые можно было выделить гибридизацией ДНК—ДНК, указывала на то, что оба конца молекулы могут служить точками начала и окончания репликации ДНК. Это предположение подтвердили биохимические электронно-микроскопические исследования [125, 163, 286, 328]. Анализируя кинетику накопления радиоактивной метки на разделенных цепях, удалось выявить градиент радиоактивности от 3'- к 5'-концу. Поскольку цепи ДНК антипараллельны, на одной цепи включение радиоактивности уменьшалось справа налево, а на другой — слева направо. В результате этих исследований стало ясно, что начало репликации ДНК аденовирусов происходит непосредственно на концах ДНК либо очень близко от них. Окончательные доказательства того, что репликация аденовирусной ДНК начинается на концах молекулы, получены при использовании систем репликации *in vitro* [175].

Лечнер и Келли [163] представили электронные микрофотографии реплицирующихся молекул ДНК и предложили модель репликации, объясняющую полученные ранее биохимические данные. Они отнесли к типу I молекулы, у которых репликация начинается на одной цепи и продвигается по дуплексу, а репликацией типа II называли рост дочерней цепи на матрице одноцепочечной ДНК (рис. 28.7). В случае реинициации до завершения предыдущего цикла репликации образуются более сложные молекулы [163]. Хотя репликация типа I может начинаться на любом конце молекулы, отмечено, что первый цикл репликации способствует реинициации на том же конце молекулы (рис. 28.8). Это наблюдение было подтверждено в системе репликации *in vitro*, где завершался синтез молекул, иницированных *in vivo* в клетках HeLa [131]. Выбор конца молекулы для первого цикла репликации, по-видимому, случаен, а причины предпочтительной реинициации на том же конце молекулы пока не выяснены.

Во время активной репликации аденовирусной ДНК в клетках подавление белкового синтеза циклогексимидом практически не влияет на инициацию и элонгацию новых вирусных цепей [128]. Эти данные позволяют предположить, что инициация синтеза новых молекул аденовирусной ДНК уникальны, а компоненты механизма ее репликации стабильны. Благодаря этому при изучении аденовирусов можно успешно применять систему репликации *in vitro* [37, 143, 147], тогда как синтез всех других

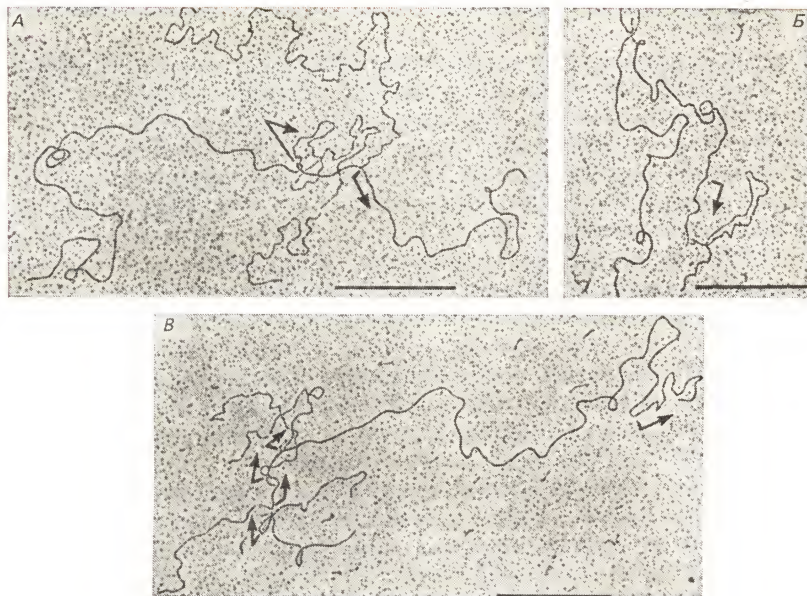


Рис. 28.8. Электронные микрофотографии реплицирующейся ДНК Ad2. А. ДНК, реплицирующаяся по типу I с двумя одноцепочечными молекулами, вытесняемыми при репликации. Обе вилки движутся с одного конца, что определено по длине одноцепочечных ветвей. Б. ДНК Ad2, содержащая частично дуплицированную цепь, реплицирующуюся по типу II. В. Молекула, реплицирующаяся по комбинированному механизму типа I и II, содержит пять сайтов репликации. Сайт репликации справа расположен в точке соединения двухцепочечной и одноцепочечной структур (репликация типа II). Остальные четыре сайта реплицируются по типу I с вытесняемыми одноцепочечными ветвями. На всех пяти сайтах репликация началась с одного конца и все растущие цепи движутся в одном и том же направлении (указано стрелками). Незначительная миграция ветвей (смещение цепи) происходит у основания каждой из репликационных вилок, что обнаружено по появлению «усов». (С разрешения из [131].)

вирусных и клеточных ДНК нуждается в постоянном синтезе белков.

Возникает вопрос, каким образом происходит инициация репликации на линейной молекуле, не образующей конкатемеров [123] и циркулярно не пермутированной [63]. В случае РНК-затравки существует проблема достройки 5'-конца после удаления затравки. Если допустить, что затравкой для синтеза дочерней цепи служит «шпилька», как у парвовирусов, то для ее образования необходимо присутствие комплементарных последовательностей на 3'-конце. Однако такие последовательности на концах аденовирусной ДНК не обнаружены [278]. Для



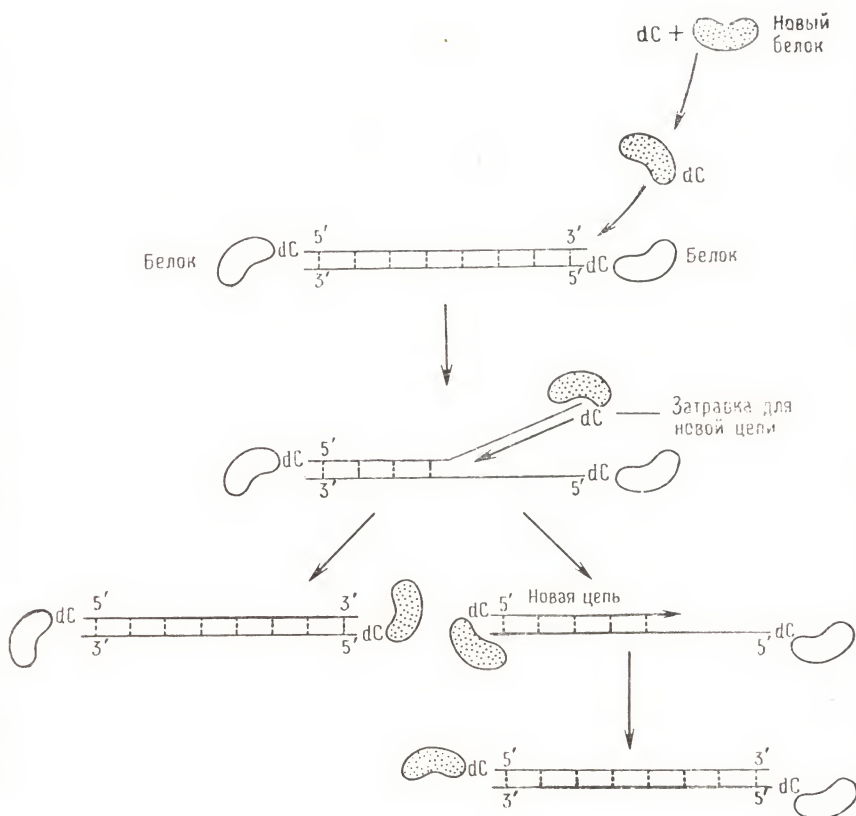


Рис. 28.9. Модель инициации синтеза ДНК аденовирусов с участием белковой затравки. Модель, впервые описанная Рекошем и соавторами [246], обсуждается в тексте.

решения проблемы инициации Рекош и соавторы [246] предложили модель белковой затравки. Согласно этой модели, ковалентное присоединение первого dXTP происходит к концевому белку (рис. 28.9). Тот факт, что растущие цепи ДНК ковалентно связаны с белком, подтверждает эту модель. Однако при анализе зараженных клеток не удалось выяснить, когда присоединяется концевой белок — в начале или в процессе роста цепи [279, 280]. Окончательные доказательства справедливости модели белковой затравки получены при использовании систем синтеза ДНК *in vitro* [175].

Синтез ДНК аденовирусов *in vitro*

Известны три основных типа систем для изучения репликации аденовирусной ДНК *in vitro*. Сначала успех был достигнут в системе целых ядер, выделенных из клеток, зараженных аденовирусами [289, 311]. Такие ядра проницаемы для меченых дезоксирибонуклеотидфосфатов. В изолированных ядрах элонгация цепей аденовирусной ДНК происходит по полуконсервативному механизму, однако, поскольку в интактных ядрах сохранялись все клеточные ДНК, полученная информация мало чем отличалась от того, что уже было известно из опытов с зараженными клетками.

Дальнейшим этапом было выделение ядер из клеток, зараженных аденовирусами, с последующей частичной солюбилизацией аппарата репликации. На основании данных о том, что в присутствии саркозила и ионов магния аденовирусную ДНК можно выделить в связи с ядерными мембранами, была создана система репликации аденовирусной ДНК *in vitro*. В этой системе использовали изолированные ядерные мембраны [228, 272, 339], и в ней были получены полноразмерные одноцепочечные молекулы вирусной ДНК. Матрицей служила эндогенная ДНК, инициация синтеза на которой уже произошла *in vivo* в составе ядерного мембранного комплекса (зона М в градиенте сахарозы). В системе присутствовали ДНК-полимеразы  $\alpha$  и  $\gamma$ ,  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеаза, кодируемый вирусом ДНК-связывающий белок, вирусный белок 11К, РНК-полимеразы II и III [247], а также хозяйская ДНК. С помощью подобных систем, так же как и в первом случае системы изолированных ядер, не удалось получить новой информации для понимания механизма репликации ДНК аденовирусов [317]. Остался нерешенным вопрос о том, является ли связывание репликативного комплекса с ядерными мембранами артефактом выделения или действительно отражает функциональную ассоциацию *in vivo*. Когда зараженные ядра после короткой инкубации с  $^3\text{H}$ -тимидином рассматривали в электронном микроскопе, радиоактивные зерна были случайным образом распределены по всему ядру [194, 273]. Эти данные были интерпретированы как опровергающие ассоциацию вирусной ДНК с ядерными мембранами при репликации. Итак, значение ассоциации промежуточных продуктов репликации аденовирусной ДНК с ядерными мембранами остается неясным, так же как и факт обнаружения реплицирующихся молекул в зоне М [317].

Следующим шагом в развитии систем репликации *in vitro* стали полностью растворимые свободные от клеточной ДНК экстракты, в которых могла реплицироваться ДНК аденовирусов [26, 143, 340]. В экстрактах ядер зараженных клеток, полученных с помощью сульфата аммония, происходила элонгация на эндо-

генных ДНК-матрицах, инициированных *in vivo*. Полноразмерные продукты, синтезированные *in vitro*, проходили те же промежуточные стадии, что и *in vivo*, и были ковалентно связаны с белком [131]. По данным электронной микроскопии в процессе синтеза *in vitro* происходила элонгация молекул I, и II типов [26, 131]. В растворимой системе репликации получены интересные данные о DBP [126]. Так, было показано, что DBP необходим для элонгации цепей ДНК. Экстракты из клеток, зараженных мутантом по DBP *H5ts125*, были не активны при повышенных температурах, но их активность восстанавливалась при добавлении очищенного DBP вируса дикого типа. Эти эксперименты объяснили, почему были неудачны попытки выяснить причины, по которым не происходит *in vivo* репликация ДНК таких *ts*-мутантов: дефектны ли они на стадии инициации или на стадии элонгации. Было показано, что перед добавлением дезоксинуклеотидов необходима преинкубация репликативного комплекса *H5ts125* для инактивации *ts*-DBP, поскольку, если репликация началась, DBP стабилизируется в репликативном комплексе. Таким образом, в условиях *in vivo* запаздывание выключения репликации на период, равный времени синтеза, может быть не результатом мутации по инициации, а результатом стабилизации продукта *ts*-гена в функциональном комплексе [312]. Эта система репликации была использована для доказательства того, что 44К-С-концевой домен DBP дикого типа может комплементировать функцию *H5ts125* при непермиссивных температурах [5]. Однако еще предстоит доказать, что 44К-фрагмент DBP действует самостоятельно при непермиссивных температурах, а не вследствие внутригенной комплементации с N-концом дефектного DBP *H5ts125* [84].

Разработанные недавно системы изучения репликации, в которых инициация и элонгация цепей полностью зависят от экзогенной матрицы [37], позволили наконец провести очистку и функциональный анализ каждого из компонентов системы репликации [84, 108, 144, 177]. Система нуждается в ДНК, ковалентно связанной с концевым белком 55К (ДНК-белок, или ДНК-Б), и 0,1 М солевом экстракте ядер из зараженных клеток, репликация в которых остановлена на ранней стадии гидроксимочевой [37]. Обнаружено, что экстракты из ядер клеток, зараженных *H5ts125*, температурочувствительны по элонгации на матрице ДНК-Б, и их активность зависит от добавления DBP дикого типа при непермиссивной температуре [144]. Показано, что по ряду критериев промежуточные продукты, образующиеся *in vitro*, действительно возникают в ходе реакции репликации. После очистки активных компонентов этой системы стало ясно, что ядра зараженных клеток можно заменить смесью экстракта из цитоплазмы зараженных клеток (Ad-цит) и экстракта из неза-



раженных ядер (ЯЭ) [127, 137]. Эти данные послужили основой для характеристики трех вирус-специфических полипептидов из цитоплазмы и двух факторов из незараженных клеток.

Дочерняя ДНК, образующаяся при репликации *in vitro*, так же как и родительская, содержит белок, ковалентно связанный с ее 5'-концом [277]. Однако она присоединена к полипептиду 80К, который является предшественником (рТР) концевой белка 55К (ТР) [38, 39]. Существует мутант *H2ts1*, дефектный по протеазе, расщепляющей ряд вирусных полипептидов, включая 80К-рТР [21]. С ДНК вирионов *H2ts1*, синтезированной при непермиссивной температуре, ковалентно связан не 55К-ТР, а его предшественник 80К-рТР. Комплекс аденовирусной ДНК с белком, выделенный из мутантных вирионов, полностью активен *in vitro*; в клетках, зараженных *H2ts1*, при непермиссивных температурах синтезируется нормальное количество аденовирусной ДНК [39]. Отсюда следует, что превращение рТР в ТР, которое обычно происходит в процессе сборки вирионов, не влияет на синтез ДНК.

Очистка факторов репликации ДНК из грубого экстракта поставила ряд задач, которые были решены при разработке специфических методов анализа отдельных стадий процесса репликации. Например, возникла необходимость отличить включение радиоактивных предшественников в ходе репликации от неспецифических репаративных синтезов, что особенно важно на ранних стадиях очистки. В грубых экстрактах из ядер незараженных клеток в присутствии комплекса ДНК-Б наблюдается активный репаративный синтез, но репликация в них отсутствует. Был разработан метод, позволяющий быстро определять специфическую репликативную активность во фракциях с колонки [127]. ДНК-Б гидролизовали ферментами рестрикции и полученные фрагменты добавляли в реакцию репликации. Специфический синтез должен происходить только на концевых фрагментах. Продукты репликации обрабатывали протеазой и в агарозном геле анализировали продукты специфического синтеза на концевых фрагментах. Этот метод, в котором измеряют одновременно и инициацию, и элонгацию, позволил установить, что концевые фрагменты участвуют по крайней мере в двух циклах репликации *in vitro* [127].

С помощью последовательной очистки факторов, участвующих в элонгации, было убедительно доказано, что для репликации необходимы три продукта вирусных генов. Один из них, DBP, необходим для элонгации как в системах, зависящих от экзогенной матрицы, так и в системах, в которых используются аммонийсульфатные экстракты ядер [144]. Это показано с помощью мутантов по DBP (*H5ts125* и *H5ts107*) и при удалении DBP из реакционной смеси для репликации [40, 67, 84, 137]. При

добавлении очищенного *H5ts107*-DBP в систему репликации, полностью зависящую от экзогенного DBP, репликативная активность при непермиссивной температуре не восстанавливалась, но при пермиссивной восстанавливалась. Вместе с тем DBP дикого типа был активен при обеих температурах. Функциональные домены DBP картировали с помощью частичного гидролиза трипсином и химотрипсином очищенного белка, высоко меченного *in vivo*  $^{32}\text{P}$ -ортофосфатом. С-Концевой химотриптический полипептид 34К полностью комплементировал функцию элонгации аденовирусной ДНК [84]. Он не содержал  $^{32}\text{P}$  в отличие от интенсивно меченного N-конца, что доказывает, что фосфорилирование DBP не имеет функционального значения для синтеза ДНК. Связывание 34К-фрагментом *H5ts107* и *H5ts125* одноцепочечной ДНК температурочувствительно при температурах выше  $33^\circ\text{C}$  в условиях, используемых для реакции репликации *in vitro* (20 мМ NaCl). В то же время связывание интактного DBP *H5ts107* не блокируется даже при  $45^\circ\text{C}$ ; это указывает на то, что несущественный для функции DBP N-конец может влиять на конфигурацию и вследствие этого на связывание С-конца [156]. Следовательно, связывание DBP необходимо, но не достаточно для комплементации синтеза ДНК, зависящего от экзогенного DBP. Еще одно подтверждение этому получено в опытах с гетерологичным DBP из *E. coli*, который связывался с аденовирусной ДНК, но функционально не замещал DBP аденовируса [5, 137]. Хотя мутанты *H5ts107* и *H5ts125* получены независимо, они несут одинаковую замену в положении 413 (пролин на серин) [159]. Это позволяет предположить существование предпочтительных сайтов для отбора жизнеспособных *ts*-мутантов по DBP.

Выделены и охарактеризованы два других вирусных продукта — 80К-рТР и 140К-ДНК-полимераза (ДНК-пол) [176]. Первоначально эти белки выделяли в виде комплекса, но их удалось разделить центрифугированием в градиенте глицерола, содержащем 1,8М мочевины. Аденовирусная ДНК-полимераза отличается от клеточных полимераз  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  не только ассоциацией с рТР, но и тем, что она не способна выполнять функциональную роль клеточных полимераз. Недавно с помощью ДНК-мутанта *H5ts149*, дефект которого картируется в гене *N* (18—22 ед. карты), было проведено подробное изучение аденовирусной ДНК-полимеразы [85, 177, 305, 332]. Было показано, что добавление ДНК-полимеразы дикого типа, свободной от рТР, комплементирует *H5ts149* [85, 177]. Эти наблюдения позволяют предположить с высокой степенью вероятности, что ДНК-полимераза кодируется вирусом и картируется в генном локусе *N*. Последние результаты по секвенированию указывают на существование открытой рамки считывания между 22,7 и 14,3 ед. карты для

Ad2 [1,94] и для Ad7 [66a], которая может служить кодирующей областью для полипептида 120K — кандидата на роль кодируемой вирусом ДНК-полимеразы.

Исследование в системе *in vitro* показали, что рТР служит затравкой для репликации ДНК [175]. Сначала к смеси неочищенного экстракта ядер незараженных клеток, цитоплазматического экстракта зараженных клеток и ДНК-Б добавляли  $^{32}\text{P}$ -dСТР в отсутствие трех других dХТР. Это приводило к образованию меченого комплекса 80K—dСМР, который обнаруживали методом электрофореза белков в ДСН-полиакриламидном геле. При дальнейшей очистке экстрактов было показано, что для образования комплекса 80K—dСМР необходимы рТР, ДНК-полимераза и ДНК-БAd, но не DBP [137]. Эксперименты с экстрактами из клеток, зараженных *ts*-мутантами по DBP, подтвердили эти биохимические данные [40, 84]. Кодируемый вирусом DBP не обязателен для инициации новой цепи в присутствии экстракта из ядер незараженных клеток. Поскольку первый dGMP является двадцать шестым нуклеотидом от каждого конца, представлялось возможным удлинить 80K—dСМР до двадцатishестичленного нуклеотидного фрагмента добавлением dАТР, dТТР и в качестве терминатора цепи ddGTP [175]. В ДСН-полиакриламидном геле подвижность рТР, соединенного с фрагментом из 26 нуклеотидов, соответствовала молекуле 88K, что удобно использовать в качестве теста для ранней элонгации. Ранняя элонгация частично стимулируется аденовирусным DBP [85, 86]. рТР — продукт вирусного генома, поскольку он транслируется *in vitro* с мРНК, отобранной с помощью фрагмента аденовирусной ДНК, расположенного от 11,2 до 31,5 карты. Вероятнее всего, рТР кодирует открытая рамка от 28,9 до 23,5 ед. карты [66a, 94, 274].

Из ядер незараженных клеток HeLa были выделены факторы, необходимые для инициации и элонгации на ДНК-Б [108, 177, 208]. В частности, к ним относится ядерный фактор I — полипептид 47K. Для полноценного функционирования он нуждается в DBP. Так как вирусный DBP не обязателен для инициации репликации вирусной ДНК, вероятно, активность фактора I в неочищенных ядерных экстрактах клеток HeLa усиливается клеточным DBP, который удаляется в процессе очистки фактора I. В этих условиях вирусный DBP, по-видимому, способен замещать DBP клеток HeLa, однако DBP *E. coli* не активен в этой системе. Недавно было показано, что фактор I узнает последовательность возле точки начала репликации аденовирусной ДНК, соединенной с белком, и селективно связывается с этой последовательностью, защищая нуклеотиды 17—48 от действия ДНК-азы I [207]. Связывание фактора I — первый пример специфического взаимодействия хозяйского фактора с аденовирусной



ДНК. Другой ядерный белок — фактор II — необходим для полной элонгации аденовирусного комплекса ДНК-Б. Он состоит из двух полипептидов — 15К и 17К. Поскольку не удается измерить активность фактора II при анализе элонгации концевых фрагментов (фрагментов, составляющих 4 и 12% генома), скорее всего он требуется для сравнительно поздней стадии элонгации. Ни фактор I, ни фактор II не обладают ДНК-полимеразной активностью. Однако фактор II обладает активностью топоизомеразы типа I, и очищенная эукариотическая топоизомераза I может замещать фактор II. Однако по размеру фактор II значительно меньше, чем топоизомераза клеток HeLa, и, вероятно, представляет собой либо активный протеолитический фрагмент, либо эукариотическую топоизомеразу I нового типа [108].

Известно, что афидиколин — ингибитор клеточной ДНК-полимеразы  $\alpha$  — подавляет синтез аденовирусной ДНК *in vitro* и *in vivo* [161, 185, 237]. Синтез аденовирусной ДНК *in vivo* значительно менее чувствителен к афидиколину, чем синтез ДНК клеток HeLa. Однако *in vitro* синтез аденовирусной ДНК подавляется примерно такими же его концентрациями, как и ДНК-полимераза  $\alpha$ . На основании данных по ингибированию афидиколином и неудачных попыток обнаружить вирус-специфическую ДНК-полимеразу полагали, что ферментом, необходимым для синтеза аденовирусной ДНК, может быть клеточная ДНК-полимераза  $\alpha$ . Однако в настоящее время показано, что ДНК-полимераза  $\alpha$  не участвует в синтезе ДНК аденовирусов. Очищенная аденовирусная ДНК-полимераза устойчива к действию высоких концентраций афидиколина. На стадию инициации — образование рТР—dСМР афидиколин не действует, но на элонгацию ДНК-Б, даже в очищенных системах в присутствии вирусного DBP, рТР, ДНК-полимеразы и факторов I и II, он действует и при низкой концентрации (100 мМ). По-видимому, мишенью для афидиколина является не ДНК-полимераза, а какой-то другой компонент системы. Согласно недавним сообщениям, ею может быть вирусный DBP. Это заключение основано на изменении скорости подавления синтеза ДНК в присутствии афидиколина в зависимости от повышения температуры до непермиссивной в культуре клеток, зараженных мутантом по DBP *H5ts125* [79].

Недавно были пересмотрены представления о роли ТР на 5'-концах родительских молекул. Известно, что протеолиз Ad-ДНК-Б значительно ингибирует репликацию ДНК *in vitro* [37, 144]. Однако, протеаза удаляет не все аминокислоты с 5'-концевого dСМР. Напротив, при гидролизе пиперидином удаляются все аминокислоты, и 5'-концевой нуклеотид оказывается не связанным с серином ТР [293]. После ренатурации денатурированной пиперидином ДНК матрица восстанавливает свою функцио-

нальную активность, и в обычных условиях на ней идет репликация. Эти наблюдения на депротеинизированной ДНК позволяют предположить, что информацию, необходимую для реакции инициации, содержат сами последовательности ДНК [108, 293, 306]. Сконструирована плазмида, рLA1, содержащая последовательность левого конца ДНК Ad5 [284]. Рестриктаза *EcoRI* линеаризует плазмиду рLA1 слева от точки начала репликации аденовирусной ДНК и активирует плазмиду для репликации

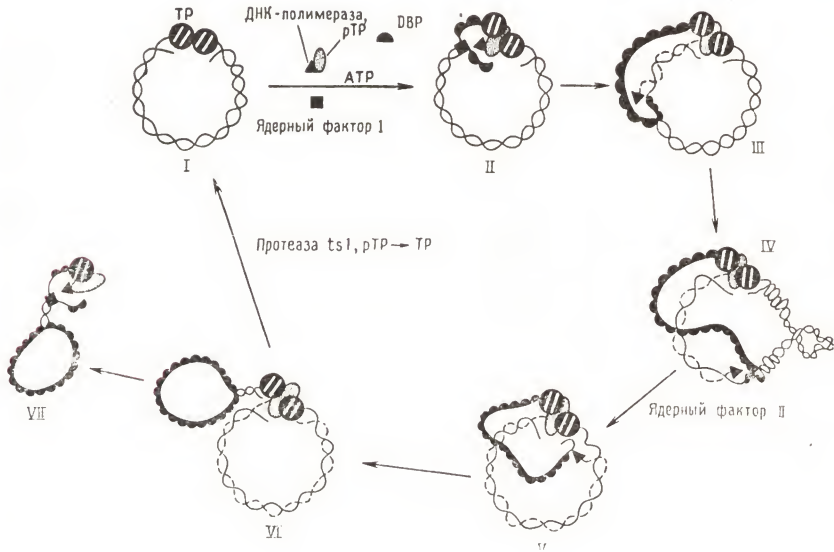


Рис. 28.10. Схема репликации аденовирусной ДНК. Предложенная модель репликации ДНК представляет собой модифицированную модель «катящегося кольца», в которой синтез происходит одновременно с вытеснением одной цепи. Вслед за инициацией и элонгацией в структуре I в результате вытеснения образуется структура II. При последующей элонгации образуется промежуточный продукт репликации (III). Структура IV накапливается в отсутствие активности топоизомеразы I. Афидиколин, не влияющий на аденовирусную ДНК-полимеразу в системе экзогенной ДНК тимуса теленка, ингибирует активную репликацию аденовирусной ДНК и приводит к образованию цепей, сходных по размеру с образующимися в отсутствие топоизомеразы. При добавлении топоизомеразы I элонгация цепей продолжается. По-видимому, топоизомераза удаляет запутанные комплексы ДНК, которые мешают движению «вилки». Однако неясно, почему элонгация цепи останавливается на 25% длины генома. Вытеснение интактной одноцепочечной молекулы из структуры VI может приводить к образованию структуры «сковорода с ручкой», обозначенной на рисунке VII. Такие структуры в процессе репликации не наблюдали. Комплементарные участки (102 основания на каждом конце), благодаря которым образуется структура VII, должны образовывать концевую структуру, идентичную концам структуры I. Концевая структура содержит двухцепочечную последовательность для связывания ядерного фактора I, который способствует специфической инициации. (С разрешения из [86].)

этой ДНК *in vitro*. Неактивными матрицами были кольцевые рLAI, плазида, линейаризованная по другим сайтам, и плазида, не содержащая аденовирусных последовательностей [108, 207, 281]. В качестве матриц использовали также ДНК делеционных мутантов с частично удаленными вирус-специфическими вставками. Мутант, у которого была удалена последовательность аденовирусной ДНК с 35 по 455 основание, был так же активен, как и исходная рLAI, а мутант с делецией от 17-го по 45-е основание был неактивен [282].

Аденовирусы серотипов 2, 7 и 12 (группы С, В и А) содержат консервативные последовательности с девятого по восемнадцатое основание на каждом конце. Замена оснований внутри этих последовательностей приводит к уменьшению функциональной активности матрицы [294]. На этом основании можно предположить существование общего участка, узнаваемого при инициации [7, 60, 270, 282]. Чтобы выявить участок, узнаваемый при инициации репликации ДНК, изучали репликацию очищенных матриц ДНК-Б различных серотипов в системе из ядерных экстрактов клеток, зараженных Ad2 [282]. Аденовирусы ДНК-Б серотипов 4, 7, 9 и 31 проявляли некоторую матричную активность в экстрактах из клеток, зараженных Ad2, но обычно активность этих систем была меньше, чем гомологичной системы ДНК-Б Ad2 и экстракта ядер клеток HeLa, зараженных Ad2. Несмотря на то что Ad2 и Ad7 обладают меньшей гомологией на участке с 1-го по 9-е основание, чем Ad2 и Ad31, ДНК-Б Ad7 значительно более активен, чем ДНК-Б Ad31. Значение репликации депротенизированной ДНК *in vitro* требует дальнейшего изучения, но уже сейчас создается впечатление, что рТР в растущей цепи имеет более важное значение для репликации аденовирусной ДНК, чем родительский концевой белок. Возможно, что узнавание и инициация облегчаются благодаря специфичности или конфигурации цепи между 9-м и 48-м основаниями на каждом из концов молекулы и родительскому концевому белку. Общая модель инициации и элонгации аденовирусной ДНК представлена на рис. 28.10.

### Поздняя транскрипция

Начало синтеза вирусной ДНК совпадает с началом поздней фазы инфекции; при этом картина резко меняется по сравнению с ранней и промежуточной транскрипцией [48, 186, 266, 297, 298]. Хотя механизм переключения с ранней фазы на позднюю малопонятен, ниже мы представим современные экспериментальные данные по этому вопросу. Во многих случаях механизм синтеза и процессинга транскриптов в аденовирусной и



эукариотической системах сходны. Новейшие данные в этой области, такие, как открытие сплайсинга, впервые получены (и правильно интерпретированы) на клетках, зараженных аденовирусами [16, 48]. О процессинге известно довольно много, включая транспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Разработаны системы, в которых аденовирусная ДНК транскрибируется *in vitro* с физиологических промоторов [193, 326]. Однако в синтезе аденовирусных мРНК *in vivo* и *in vitro* существуют значительные различия, которые пока не имеют объяснения.

#### Механизм переключения ранней транскрипции на позднюю

Механизм действия факторов, ответственных за переключение транскрипции с ранней фазы на позднюю, изучен еще недостаточно. Недавно получены экспериментальные данные, указывающие на то, что некоторые из этих факторов действуют по цис-механизму [298]. Клетки последовательно заражали двумя родственными аденовирусами группы С, продукты трансляции и полипептиды которых можно различить. В эксперименте ставилась задача определить, могут ли экспрессироваться поздние гены с нереплицирующейся ДНК (Ad2+ND1dp2) суперинфицирующего вируса при заражении клеток, в которых уже происходит поздняя вирусная транскрипция на первично введенном вирусе (Ad5ts125). Было показано, что в условиях эксперимента поздняя транскрипция ДНК Ad2+ND1dp2 отсутствовала. Какова природа цис-действующих факторов регуляции транскрипции, неизвестно; не исключено, что таким фактором является какое-то свойство самой вирусной ДНК. Показано, что регуляция не связана с метилированием ДНК [315]. В одном из объяснений предполагали существенную роль в регуляции замены концевой белка 55К введенного вируса на 80К-предшественник в растущей цепи, в другом — протяженного одноцепочечного участка ДНК, что кажется маловероятным, так как транскрипция происходит на ds-матрице [25, 33]. К тому же поздняя транскрипция продолжается в клетках даже после того, как ингибиторами (или сдвигом температуры в случае ts-мутантов) прерывается уже начавшийся синтез ДНК [298]. Предполагали также нуклеосомные различия [295] и пространственное разделение ДНК-матриц, но ни одна из гипотез не была проверена.

Анализ полисомом через 18 ч после заражения Ad2 показал, что практически все мРНК были вирус-специфическими [15, 186]. Уровень накопления вирусных транскриптов в 10 раз превышал уровень, характерный для ранней фазы. Хотя транскрипция хозяйских последовательностей в ядре продолжалась, в цитоплазму переносилась лишь незначительная часть транскриптов [15].

Точный механизм блокировки процессинга хозяйских последовательностей не установлен, но, по-видимому, блокировка происходит после полиаденилирования. Протяженность вирусной транскрибируемой последовательности соответствует примерно 50% потенциальной информации в обеих цепях (рис. 28.11). Транскрипты, гомологичные *r*-цепи, соответствуют примерно 80% кодирующей емкости этой цепи, в то время как транскрипты, гомологичные *l*-цепи, представляют около 20% емкости этой цепи [107, 266]. Регуляция синтеза непосредственно ранних, пред-ранних (E1A), задержанно ранних (E1B, E2A, E2B, E3, E4) и промежуточных (IVa2, IX) транскриптов в поздней фазе очень сложна. Количество L1 как транскрипта поздней области значительно увеличивается, но он синтезируется и как один из непосредственно ранних транскриптов. В ранней фазе L1 может транслироваться с образованием полипептидов 52K и 55K [267]. Однако IIIa-мРНК, входящая в ту же группу поздних транскриптов и имеющая тот же сайт полиаденилирования, что и участок, кодирующий 52—55K-полипептиды, не синтезируется в ранней фазе инфекции [267]. Эти данные позволяют предположить, что регуляция осуществляется на уровне сплайсинга РНК. Почему в ранней фазе блокирована транскрипция с других поздних районов, таких, как L4 и L5, неизвестно. Остается также невыясненным вопрос о времени транскрипции участков L2 и L3. Некоторые исследователи обнаруживали L2- и L3-транскрипты в ранней фазе, но никому не удалось обнаружить продукты трансляции с транскриптов L2—L5. E2A-мРНК и кодируемый ею полипептид DBP синтезируются как в ранней, так и в поздней фазе инфекции, однако во время поздней фазы точка инициации транскрипции основной лидерной последовательности меняется с 75 ед. карты на 72 ед. карты; минорный лидер при этом расположен около 87 ед. карты [27] (рис. 28.11). Транскрипция другой ранней области, E4, ингибируется на поздней стадии аденовирусным DBP [22, 212]. Результаты, полученные в системе транскрипции *in vitro* (см. ниже), позволяют предполагать, что DBP непосредственно подавляет транскрипцию с промотора E4 [110]. Промежуточные транскрипты для полипептидов IVa2 и IX продолжают синтезироваться в поздней фазе. Оба этих полипептида нужны для сборки вириона [266].

#### Открытие сплайсинга молекул мРНК

Аденовирусы послужили моделью при изучении ряда общесбиологических процессов у эукариот. Одним из наиболее значительных открытий было отсутствие коллинеарности между мРНК и кодирующими их генами. Полученные результаты привели к предположению о том, что мРНК являются продуктом





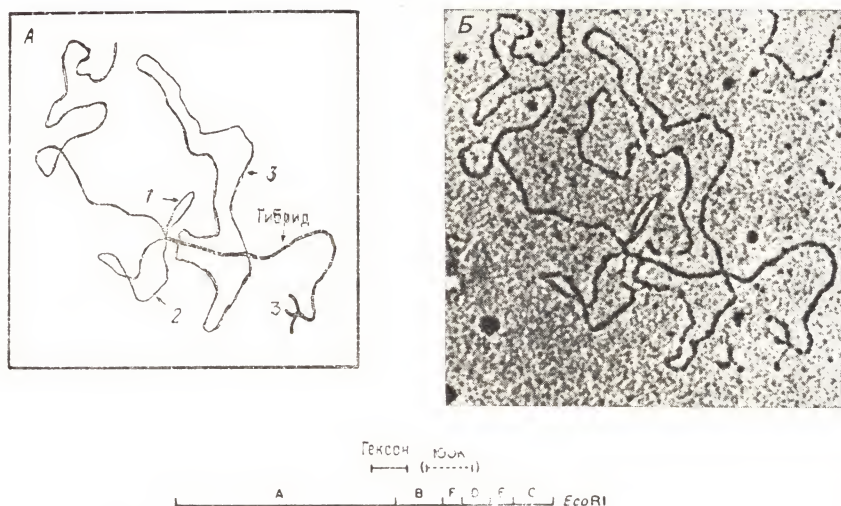


Рис. 28.12. Обнаружение сплайсинга на 5'-конце гексоновой мРНК Ad2. А. мРНК гексона гибридизуется не только со своей кодирующей последовательностью, но и с тремя короткими фрагментами в трехдольном лидере. Участки ДНК, не образующие дуплексов с РНК, образуют одноцепочечные петли, обозначенные на схеме как 1, 2 и 3. Б. Электронная микрофотография гибрида между одноцепочечной ДНК фрагмента 1 *Eco* RI и гексоновой мРНК и схема расположения последовательности, кодирующей гексон по отношению к местам расщепления рестрикционной эндонуклеазой *Eco*RI. (С разрешения из [16].)

соединения транскриптов отдельных участков генома, и внесли огромный вклад в понимание биогенеза эукариотических мРНК [16, 44а, 48]. После гибридизации мРНК гексона с кодирующим его фрагментом (50—60 ед. карты) было обнаружено, что 5'-концевой участок мРНК остается неспаренным. Это побудило к поискам другой последовательности ДНК, которая гибридизовалась бы с этим 5'-концом [16]. Как следовало из опытов с одноцепочечной ДНК, формирование 5'-концов посредством миграции ветви по двухцепочечной ДНК было исключено. При гибридизации мРНК гексона с *r*-цепью *Eco*RI-фрагмента (0—55 ед. карты) наблюдали структуру, представленную на рис. 28.12. Три петли одноцепочечной ДНК в положениях 16,8; 19,8 и 26,9 ед. карты были правильно интерпретированы как неспаренные участки ДНК, чередующиеся с короткими районами гомологии между *Eco*RI-фрагментом ДНК и гексоновой мРНК. К аналогичному заключению привели независимые эксперименты, в которых после образования R-петель между суммарной мРНК и полноразмерной аденовирусной ДНК проводили вторую гибридизацию с денатурированными рестрикционными фрагментами левого

конца генома [48]. На электронных микрофотографиях удалось установить положение гексоновой мРНК и лидерных последовательностей в одной молекуле. Подобные эксперименты были повторены с мРНК других поздних структурных и неструктурных полипептидов. Оказалось, что и здесь лидерные последовательности картировались в районе 16,6; 19,6 и 26,6 ед. карты, а положение основной кодирующей последовательности соответствовало положению на генетической карте, которое определяли ранее для каждого полипептида другими методами.

Биохимическое подтверждение сплайсинга получено из многих источников. На 5'-концах смеси поздних мРНК Ad2 так же, как и на 5'-концах очищенных мРНК белка фибриллы и полипептида 100К, обнаружена уникальная 11-членная последовательность [92, 151]. Соответствующие кодирующие последовательности (86,3—91,3 ед. карты для белка фибриллы; 66,1—78,3 ед. карты для полипептида 100К) не предохраняли 11-членную последовательность на 5'-конце мРНК от гидролиза РНКазой А. Однако последовательность от 14,7 до 21 ед. карты защищала 5'-концевую последовательность и мРНК белка фибриллы, и мРНК полипептида 100К [151]. В других экспериментах фрагмент ДНК от 17 до 29,1 ед. карты гибридизовался со многими поздними мРНК, которые были активны в системе трансляции *in vitro* [307]. В дополнение к сайтам сплайсинга, описанным для «трехдольного» лидера поздних мРНК, определены многие другие сайты сплайсинга, представленные на рис. 28.11. Это сайты для каждой из пяти групп поздних генов (L1—L5), дополнительная лидерная последовательность для мРНК белка фибриллы и точки сплайсинга на *l*-цепи. Ранние мРНК, считываемые и с *r*- и с *l*-цепей, также подвергаются сплайсингу. Не сплайсирована только мРНК белка IX. Последовательности, узнаваемые при сплайсинге аденовирусных мРНК, в основном те же, что и при сплайсинге эукариотических транскриптов (GU на 5'-конце и AG на 3'-конце удаляемого фрагмента) [251, 314a]. Помимо сплайсинга существуют и другие механизмы соединения нуклеотидных последовательностей. В других системах, таких, как биосинтез цепей иммуноглобулинов [64], обнаружены различные внутри- и межмолекулярные рекомбинации ДНК. Однако ясно, что у аденовирусов сплайсинг мРНК происходит на уровне транскриптов. Механизм и энзимология сплайсинга малопонятны, но предполагают, что в этом процессе принимают участие особые вирус-ассоциированные (VA) РНК (см. ниже) [197].

#### **Синтез поздних мРНК**

Участок, кодирующий декануклеотид, содержащий 10 из 11 оснований на 5'-концах поздних мРНК, локализован в районе 16,4 ед. карты [92]. Этот декануклеотид, к которому 5'-GTP (кэп)

присоединяется посттранскрипционно, расположен непосредственно перед первым участком сплайсинга трехдольного лидера. Он синтезируется РНК-полимеразой II — ферментом, синтезирующим все аденовирусные мРНК. РНК-полимераза II и синтез аденовирусных мРНК одинаково чувствительны к низким дозам  $\alpha$ -аманитина [240, 320]. Последовательность около промотора может содержать структуру «стебель и петля» (stem-and-loop) [342]. Промотор располагается через 31 основание от последовательности ТАТАААА, однако делеции в этом участке не запрещают транскрипцию *in vivo* [11]. Основания 5—13 на 5'-конце мРНК комплементарны последовательности около 3'-конца 18S-рРНК [342]. Функциональное значение этого факта еще неясно.

Синтез поздних транскриптов начинается от 16,45 ед. карты и продолжается вправо до примерно 99 ед. карты [70, 82, 342]. Это заключение основано на экспериментах трех типов. В экспериментах первого типа, в которых проводили гибридизацию рестрикционных фрагментов правого конца генома с ядерными импульсно-мечеными транскриптами, обнаружили, что гомологичные молекулы РНК довольно длинные [10, 324]. Но они были гораздо короче в случае рестрикционных фрагментов, расположенных ближе к 16,45 ед. карты. Время введения метки было меньше, чем время синтеза полных транскриптов длиной 26 kb. Сходный вывод позволяют сделать данные по УФ-картированию [98]. Статистически более вероятна инактивация ультрафиолетом синтеза протяженных участков нуклеиновой кислоты, чем коротких. Чувствительность к УФ первичного транскрипта гена белка фибриллы, расположенного в правой части генома (86,3—91,3 ед. карты), оказалась значительно выше, чем можно было бы ожидать, исходя из длины участка, кодирующего полипептид. Данные электронной микроскопии подтвердили основные выводы этих двух биохимических методов [202].

Обычно у эукариот не происходит инициации трансляции на внутренней последовательности мРНК. Конфигурация пяти групп мРНК с фиксированным 3'-концом и альтернативными кодирующими 5'-последовательностями гарантирует, что все гены первоначальных транскриптов будут транслироваться (рис. 28.11).

Полиаденилирование (присоединение 150—200 оснований к 3'-концу) пяти групп поздних транскриптов существенно для транспорта зрелых ядерных транскриптов в цитоплазму или для стабилизации транскриптов в цитоплазме. Добавление аналогов аденозина — тойакамина и кордицепина, подавляющих синтез poly(A)-последовательности, приводит к накоплению в ядре длинных РНК-транскриптов [200, 314]. Однако Зиви и соавторы обнаружили, что мРНК, не содержащие poly(A), тоже способны



выходить в цитоплазму, но оказываются короткоживущими [341]. Полиаденилирование около гексануклеотида AAUAAA, общего для 3'-концов многих аденовирусных мРНК, можно экспериментально разобщить от эндорибонуклеазного расщепления, происходящего на концах транскриптов пяти групп поздних мРНК [82, 204a]. Внутренний сплайсинг фрагментов лидера происходит после отщепления 3'-конца транскрипта [211]. Механизм, согласно которому происходит выбор одного из пяти возможных участков для расщепления, неизвестен. Оказалось, что некоторые первичные транскрипты нарезаются еще до завершения синтеза полноразмерной РНК. В этих случаях элонгация транскриптов продолжается за сайтом эндорибонуклеазного отщепления. Такое нарезание происходит менее чем у половины синтезируемых молекул, в противном случае нельзя было бы определить положение промоторных участков 3'-концевых транскриптов [10, 20a, 324]. Однако есть данные о том, что GMP не включается в кэп до тех пор, пока не присоединится poly(A).

#### Вирус-ассоциированные РНК

Существуют две небольшие РНК с выраженной вторичной структурой, напоминающей структуру тРНК. Они синтезируются с *г*-цепи аденовирусной матрицы, начиная с 29 ед. карты [34, 35, 196, 218]. В отличие от мРНК они синтезируются РНК-полимеразой III и не кодируют полипептиды [62, 240a, 329]. Вирус-ассоциированная (VA) РНК I длиной в 155 нуклеотидов была первой аденовирусной РНК, для которой определили первичную структуру [218]. Второй сходный продукт — VA-РНК II кодируется справа от VA-РНК I и не обнаруживается в клетках, зараженных Ad12. Оказалось, что каждая из этих двух РНК имеет собственный сайт инициации, но обе содержат кэп 5'-pppGp [199]. Промоторы для РНК-полимеразы III располагаются внутри транскрибируемого участка между (+58) и (+68) ед. карты [80, 108a]. Регуляция синтеза двух VA-РНК осуществляется координированно. Если синтез VA-РНК I уменьшается из-за делеции, то синтез VA-РНК II при этом увеличивается. Функции VA-РНК в зараженных клетках до сих пор до конца не ясны. Получены данные, свидетельствующие о том, что VA-РНК могут присоединяться в местах сплайсинга к поздним мРНК и способствовать сплайсингу первичных транскриптов [197]. Показана ассоциация VA-РНК с белками нуклеопротеиновых комплексов (Sn РНП, которые узнаются La-антителами, обнаруженными в сыворотках больных системной волчанкой [165]). При добавлении La-антител к ядрам клеток, зараженных Ad2, ингибируется сплайсинг E1A-мРНК [341]. В незараженных клетках в нуклеопротеиновом

комплексе, несущем антигенные детерминанты La, обнаружена U1-РНК [165]. Однако U1-РНК имеет существенную гомологию с последовательностями типичных сайтов сплайсинга, в то время как VA-РНК I отличается от последних [165a]. Согласно недавно полученным данным, VA-РНК контролирует скорость трансляции поздних аденовирусных белков [296]. Делеционный мутант по VA-РНК I (*dl 330*), в котором VA-РНК II остается интактной, продуцирует меньшие количества поздних белков. VA-РНК I не влияет на какую-либо из стадий биогенеза мРНК, поскольку трансляция мРНК *dl 330 in vitro* проходит нормально. Таким образом, предполагаемая функция VA-РНК I как регулятора сплайсинга не объясняет блокировки трансляции.

### Транскрипция аденовирусной ДНК *in vitro*

Разработано несколько систем транскрипции *in vitro*, в которых в качестве матрицы используется аденовирусная ДНК. Одна из них включает очищенную РНК-полимеразу II и цитоплазматический экстракт [326]. Другая система, в которой используют экстракт цельных клеток HeLa, не нуждается в экзогенной РНК-полимеразе [193]. Обе системы узнают вирусные и клеточные промоторы. Многие продукты транскрипции идентичны мРНК, синтезируемым *in vivo*, включая формирование кэпа и метилирование 5'-концов. Среди преимуществ растворимой системы транскрипции следует отметить возможность очистки эндогенных факторов, регулирующих различные этапы биогенеза мРНК, и использования очищенных факторов для восстановления активной системы. Был изучен каскад взаимосвязанных событий, следующих за аденовирусным заражением [76]. В экстрактах из незараженных клеток HeLa *in vitro* эффективно узнаются шесть промоторов: E1A (1,4 ед. карты), E1B (4,7 ед. карты), белка IX (9,8 ед. карты), основной поздний (16,4 ед. карты), E3 (76,6 ед. карты) и E4 (99,1 ед. карты). ТАТА-последовательности этих промоторов расположены в положениях от (—25) до (—31). Три транскрипта — IVa2 (15,9 ед. карты), E2A (ранний, 75 ед. карты) и E2A (поздний, 72 ед. карты) — не имеют ТАТА-последовательностей и слабо транскрибируются *in vitro*. Транскрипт E2A (поздний, 72 ед. карты) имеет вместо ТАТА последовательность ТАСААА, но это полностью не объясняет низкий уровень транскрипции, поскольку в других случаях, когда она расположена вблизи промоторов других эукариотических мРНК, она активна. Делеция ТАТА-последовательностей не уменьшает уровень транскрипции *in vivo*, однако точки инициации у мутантов с такой делецией часто сильно различаются. Напротив, ТАТААА-последовательность важна *in vitro*, и делеция с (—51) по (+5) нуклеотид по отношению к кэп-структуре сильно влияет на транскрипцию. Несмотря на эти различия в

регуляции, промоторы, активные *in vitro*, удивительно сходны с действующими *in vivo*. Корреляция с характером транскрипции *in vivo* выявляется в опытах с увеличением количества ДНК или использованием поздних экстрактов. Подобные условия характерны для поздней стадии инфекции; при этом усиливается транскрипция *in vivo* с основного позднего промотора и гена полипептида IX. Следует помнить, что *in vivo* основной поздний промотор активен и в ранней фазе инфекции и транскрибируется примерно с той же скоростью, как и аутентичные ранние участки. Таким образом, использование экстрактов из незараженных клеток HeLa для поддержания поздней транскрипции аденовирусов не является нелогичным, как это кажется на первый взгляд. Однако действительно в поздних экстрактах присутствуют уникальные факторы, которые способствуют увеличению скорости синтеза поздних транскриптов и, вероятно, распространению транскрипции за точку, соответствующую 39 ед. карты. При использовании в качестве матрицы для транскрипции *in vitro* сердцевины аденовирусов характер транскрипции изменялся, что, по-видимому, обусловлено изменениями в структуре ДНК, вызываемыми белками сердцевины [55].

Растворимый экстракт для транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы II в настоящее время используется и для изучения сплайсинга транскриптов. Оказалось, что этот важный этап биогенеза функционально активных мРНК воспроизводится *in vitro* [99, 225, 227а, 327]. Изучались также сходные системы, в которых транскрибируется 5,5S-РНК с помощью РНК-полимеразы III *in vitro*. Этот подход обещает дать важную информацию о транскриптах, синтезируемых этой полимеразой [338].

### Поздние полипептиды

Изучение поздних вирусных полипептидов, максимальный синтез которых наблюдается через 20 ч после заражения, облегчено тем обстоятельством, что в это время синтез клеточных белков подавлен [2, 130, 321]. Большинство вирусных белков, синтезирующихся на поздней стадии, представляют собой структурные белки вириона или их предшественники. Однако продолжают синтезироваться и некоторые ранние белки. Например, ранний неструктурный белок DBP синтезируется и в поздней фазе [2, 310]. Другие неструктурные белки, такие, как белки 100К, 50К и 39К, участвующие в различных этапах сборки, синтезируются как поздние белки [58, 220, 230а].

### Картирование генов поздних вирусных белков

Первоначально структурные гены картировали с помощью классических методов генетической рекомбинации [333]. Практически все поздние полипептиды кодируются РНК, комплемен-



тарной *r*-цепи; исключения составляют несколько транскриптов выше 30 ед. карты. Положение мРНК на карте генома уточняли биохимическими методами. мРНК выделяли гибридизацией с рестрикционными фрагментами аденовирусной ДНК. После элюции мРНК транслировали *in vitro* и полученные продукты анализировали в полиакриламидных гелях [172—174]. Модификацией этого метода, позволяющей более точно картировать положение генов, служит остановка трансляции гибридами (ОТГ или HART от англ. hybrid arrested translation) [227, 248]. В методе HART также используют определенные рестрикционные фрагменты ДНК, но в нем не требуется очистка мРНК. Денатурированный фрагмент двухцепочечной ДНК или одну из его цепей отжигают со смесью мРНК, и мРНК до и после гибридизации ДНК — РНК транслируют *in vitro*. Гомологичные мРНК гибридизуются с ДНК и поэтому не транслируются. Когда рибосома и растущая цепь в процессе элонгации наталкиваются на двухцепочечный гибрид ДНК — РНК, остановка трансляции происходит внутри полипептида. HART — очень точный и простой в исполнении метод, для которого не требуется очистка мРНК, обычно сопровождающаяся потерями материала. Порядок трансляции полипептидов с поздних мРНК, содержащих трехдольный лидер 52K—55K, IIIa, III, IVa, pVII, V, pVI и II был определен с помощью метода HART. Этот метод с использованием гибридизации ДНК — РНК в значительной мере вытеснил картирование с помощью рекомбинации между серотипами, основанной на различиях вирусных полипептидов разных серотипов [259].

Поскольку транскрипты имеют общие 3'-концевые участки полиаденилирования, но различные по длине основные кодирующие последовательности, трансляция каждой из мРНК может начинаться с ближайшего к 5'-концу иницирующего кодона ATG. Это важно в связи с тем, что эукариотические мРНК не способны к внутренней инициации трансляции. Три из одиннадцати (II—XII) структурных белков образуются из полипептидов-предшественников (pVI, pVII и pVIII), которые нарезаются на последней стадии созревания вируса [21, 182, 322]. Полипептиды X—XII, по-видимому, являются продуктами процессинга больших полипептидов, таких, как основной полипептид сердцевины [132].

### Сборка вирионов

Сборка вирионов в ядре — сложный процесс, начинающийся со сборки одиночных полипептидов в капсомеры в цитоплазме [130]. Капсомер гексона представляет собой тример, состоящий

из трех идентичных полипептидов (II), прочно удерживаемых вместе без участия ковалентной пептидной или дисульфидной связей. Время синтеза мономеров гексона составляет 3,4 мин, причем сборка 80% мономеров происходит быстро:  $T_{1/2} \cong 4$  мин [130]. Полипептиды пентона синтезируются в течение 1,6 мин. Сборка капсомера из пяти полипептидов основания пентона и трех полипептидов фибриллы имеет двухфазную кинетику. 25% пентонов собирается быстро в течение 20 мин, а остальные — в течение 10—11 ч [130]. Сборка гексона осуществляется с помощью другого вирус-специфического полипептида. Представленные выше результаты были получены при изучении двух *ts*-мутантов — *H5ts17* и *H5ts20*, у которых не происходит сборки тримеров гексона [179]. В детальных пептидных картах дикого типа и мутантов *ts17* и *ts20* не выявляется каких-либо структурных различий между их полипептидами гексонов. *ts17* и *ts20* несколько отличались фенотипически от дикого типа по действию на сборку цианида и циклогексимида после перехода к пермиссивным условиям. На основании этих экспериментов можно предположить, что *ts*-повреждение находится в другом пептиде (или пептидах) и что дефектный полипептид функционирует в качестве «белка подложки» [179]. «Белок подложки» определяют как белок, необходимый в процессе образования капсомеров, но отсутствующий в конечном продукте. Это определение подтверждается тем, что и мутанты *ts17*, и мутанты *ts20* имеют повреждения в 100К-белке, который интенсивно связывается с мономером гексона, но быстро освобождается при тримеризации [36, 87, 220]. Оказалось, что 100К-белок связывается с образующимися полипептидами гексона на полисомах [36]. Сборка тримеров гексона из мономеров и участие в ней 100К-белка были воспроизведены в системе *in vitro* [36, 311]. С геном 100К-белка частично перекрывается ген небольшого полипептида 33К, но полипептид 33К транслируется в другой рамке и поэтому не имеет общих с белком 100К олигопептидов и не участвует в сборке [219]. Возможна самосборка пустых капсидов из капсомеров гексона, по-видимому, через образование наномеров, каждый из которых соответствует одной из 20 сторон вириона. При разрушении аденовирусов обычно обнаруживаются наномеры, но их не удается выделить в качестве промежуточных продуктов сборки. Детали сборки пентона еще предстоит выяснить.

Из опытов с *ts*-мутантами по сборке и с обратимой сшивкой лабильных промежуточных продуктов сборки вытекает, что следующим этапом сборки является стадия капсида или «легкого интермедиата» [59]. Капсид с константой седиментации 600S и плавучей плотностью в CsCl 1,315 г/см<sup>3</sup> содержит полипептиды рVI, рVIII, 50К, 39К и IIIа и, конечно, гексон [58]. Полипептиды рVI и рVIII обычно ассоциированы с наномерами гексона из

разрушенных вирионов, а полипептид IIIa связан с перипентонными гексонами [71]. На этой стадии присутствует 11S-фрагмент ДНК, ассоциированный с легким капсидом. Этот фрагмент, по-видимому, является интермедиатом, захваченным в процессе введения генома в заранее сформированный капсид. Он представлен преимущественно левым концом генома, содержащим в пределах первых 400 нуклеотидов последовательность узнавания для упаковки ДНК [109]. Субгеномный размер ДНК объясняется, вероятно, разрывом частично упакованной 34S-ДНК в процессе выделения промежуточного продукта. Расшифровка сигнала, который направляет упаковку с левого конца, первоначально казалась странной, поскольку у большинства серотипов аденовирусов 100—150 нуклеотидов идентичны на обоих концах молекулы ДНК. Вопрос решили с помощью серии мутантов Ad16, которые содержали редупликации последовательностей левого конца (от 200 до более 500 нуклеотидов) на правом конце генома. Анализ этих мутантов показал, что если редуплицировано более 390 нуклеотидов, то инкапсидация начинается с любого конца, тогда как при редупликации менее 290 нуклеотидов сохранялось преимущество инкапсидации с левого конца. Таким образом, создается впечатление, что сигнал узнавания должен быть между 290 и 390 основаниями слева. Эта последовательность перекрывается с некоторыми регуляторами транскрипции E1A.

Полипептиды 50K и 39K действуют как «подложки» при образовании легкого капсида, поскольку они удаляются на следующем этапе [58]. Полипептид 50K, по-видимому, является полипептидом IVa2 и синтезируется с *l*-цепи в обеих фазах инфекции [230a]. Следующий промежуточный продукт сборки седиментирует так же, как 600S-частицы, но имеет по сравнению с ними большую плавучую плотность ( $1,37 \text{ г/см}^3$ ) в CsCl. Он содержит 34S-ДНК, связанную с 80K-предшественником TP, но не содержит белков сердцевин. Последние добавляются на следующем этапе в виде полипептидов V и pVII. Инкапсидация вирусной ДНК идет и без них. Полагали, что для нейтрализации заряда ДНК перед упаковкой необходимы основные ДНК-связывающие белки. Ранние исследования кинетики заполнения вириона различными полипептидами показали, что после 30-минутной инкубации с радиоактивной меткой она появилась сначала в белках сердцевин, а затем в гексоне [130]. Эти результаты согласуются с представлениями о том, что внутренние полипептиды включаются в заранее собранную пустую оболочку, которая была синтезирована и собрана еще до 30-минутного мечения.

Предполагают, что «голая» ДНК входит в капсид через одну из открытых вершин. Количество полипептидов основания пентона и фибриллы в капсиде на каждом из этапов сборки точно не



известно. Некоторые исследователи считают, что большинство из 12 вершин содержат капсомер пентона уже на ранней стадии формирования капсида, однако другие не обнаруживают значительных количеств полипептидов основания пентона и фибриллы до стадии «молодого» вириона [138a]. Белок IX также появляется на стадии «молодого» вириона. «Молодые» вирионы имеют константу седиментации 750S и плавучую плотность 1,345 г/см<sup>3</sup>. На последней стадии вирусного морфогенеза происходит расщепление всех предшественников, и фрагменты белков рVI, рVIII, рVII и рTP или освобождаются, или деградируют; при этом частицы уплотняются и становятся недоступными для нуклеаз. Протеаза — это полипептид 23K, кодируемый транскриптом L3. Мутант *Ad2ts1* при повышенных температурах дефектен по протеазе [21]. Протеаза локализована внутри вириона, и пока частица не разрушена, она не чувствительна к действию таких ингибиторов, как L-1-тозиламид-2-фенилэтилхлорметилкетон или фенилметансульфонилфторид. Свободная протеаза локализована в ядре зараженной клетки, где она прикреплена к мембранам. У другого мутанта — *H2ts3* — блокировано расщепление рVII, тогда как нарезание Va (27K) и Vb (24K) с образованием рVI и рVIII происходит нормально [323]. Молекулярные основы этого избирательного дефекта протеолиза неизвестны.

По данным электронной микроскопии и «зрелые», и «молодые» вирионы расположены в ядре зараженной клетки. Однако, когда препарат готовят с помощью детергента NP40, «зрелые» вирионы полностью уходят из ядра в цитоплазму, а «молодые» вирионы остаются в ядре. Этот артефакт фракционирования клетки полезен при разделении «молодых» и «зрелых» вирионов.

Сборка вирионов блокируется при недостатке аргинина [24] или при повышении температуры инкубации клеток, зараженных вирусом дикого типа [178]. В последнем случае влияние на синтез белков минимально, а сборка капсомеров подавляется значительно. При понижении температуры с 42 до 37°C сборка возобновляется, и гексон, синтезированный при 42°C, собирается при 37°C. Природа аргининового блока неясна, но для его снятия необходим синтез новых белков. Сообщение о сборке вириона *in vitro* из радиоактивно меченной ДНК, синтезированной *in vivo* в отсутствие аргинина, нуждается в подтверждении [336].

### Дефектные частицы

В процессе сборки образуется некоторое количество дефектных частиц, особенно много в клетках, зараженных вирусами группы В [Ad 3, 7 и 16], и мало в клетках, зараженных вирусами

группы С (Ad 2 и 5) [54]. В данном случае дефектные вирионы не относятся к дефектным интерферирующим (ДИ) частицам, как у некоторых других вирусов [54]. Молекулярный дефект этих частиц состоит в неполной упаковке ДНК. Капсиды могут содержать различное количество ДНК и имеют плотность в CsCl, соответствующую диапазону от плотности пустых капсидов до плотности полноценных вирионов [54, 299]. Неполные вирусные ДНК обогащены последовательностями левого конца генома. Складывается впечатление, что это обусловлено обрывом в разных точках цепи входящей ДНК (в норме для ее входа требуется левый участок из 390 нуклеотидов). Причины aberrантной упаковки аденовирусов группы В еще предстоит выяснить. Известно лишь, что некоторые молекулы ДНК содержат протяженные участки инвертированных повторов последовательностей левого конца; возможно, aberrантная упаковка объясняется аномальным синтезом вирусной ДНК. Некоторые дефектные частицы способны трансформировать реципиентные клетки, поскольку для трансформации необходим лишь левый конец генома (0—12 ед. карты).

### **Взаимодействие аденовирусов с другими вирусами**

Аденовирусы специфически взаимодействуют с некоторыми другими вирусами, в том числе с обезьяньим вирусом 40 (SV40) и адено-ассоциированными вирусами (ААВ). Некоторые серотипы аденовирусов первоначально выращивали в культуре ткани почек обезьян [114], пока не поняли, что клетки этого вида лишь тогда эффективны для продукции аденовирусов, когда в них присутствуют SV40 [241]. При попытках элиминировать SV40 с помощью гипериммунных сывороток была обнаружена внутримолекулярная рекомбинация между ДНК аденовируса и SV40; вероятно, выявлению рекомбинантов способствовал отбор под действием антител [134, 169а, 243]. Рекомбинантные ДНК упакованы в аденовирусный капсид, и таким образом полученный вирус защищен от антител к белкам SV40. В интегрированном состоянии SV40 осуществляет функции помощника, способствуя размножению аденовирусов в культуре клеток почек обезьян (CV1). С репродукцией аденовирусов сопряжена репликация дефектных парвовирусов ААВ [139, 252]. Аденовирусы являются помощниками этих мелких вирусов, содержащих одноцепочечную ДНК. Однако ААВ частично подавляют репликацию аденовирусов, что приводит к уменьшению инфекционности последних. Недавно обнаружены продукты репликации аденовирусов, комплементирующие размножение ААВ [139, 201].

## SV40 — вирус-помощник аденовирусов

Блокировку репликации аденовирусов в клетках обезьян (CV1) можно снять коинфекцией SV40. В ряде исследований убедительно показано, что блок репликации аденовирусов в клетках CV1 происходит на поздней стадии вирусного цикла. Ранние события вирусной репликации (адсорбция, проникновение, синтез ранних мРНК и вирусной ДНК) в клетках CV1 протекают нормально и без вируса-помощника [13, 83, 245]. Поздние аденовирусные мРНК в этих клетках обнаруживаются [73, 81, 152, 187], однако некоторые из них присутствуют в меньшем количестве; это особенно заметно для мРНК фибриллы [152]. У 15—30% молекул сплайсинг этой мРНК происходит аномально [153]. Кроме того, наблюдали значительное уменьшение синтеза полипептидов гексона и основания пентона, а также белков IIIa и 11,5K [73, 152]. Некоторые исследователи считают, что 10—20-кратное уменьшение синтеза мРНК фибриллы и неправильный сплайсинг не могут иметь решающего значения для наблюдаемого 100-кратного уменьшения уровня синтеза вирионов и что необходимо искать другие функциональные повреждения [343]. В системе трансляции *in vitro* изучали мРНК фибрилл, выделенные из клеток CV1, зараженных только аденовирусом (непермиссивные условия) и совместно с SV40 (пермиссивные условия). Сначала были получены противоречивые данные [152], но в настоящее время показано, что в обоих случаях количество полипептида фибриллы, синтезируемое *in vitro*, одинаково [3, 69]. Оказалось, что *in vitro* не удастся воспроизвести блок синтеза аденовирусных полипептидов, регистрируемый в клетках обезьян. В отличие от исходных клеток обезьян гибридные клетки обезьяны — человек пермиссивны для репликации аденовирусов. В клетках, реконструированных из ядер (кариопластов) клеток человека и цитоплазмы (цитопластов) клеток обезьян, белок фибриллы синтезируется, тогда как при обратной комбинации (кариопласты обезьян и цитопласты человека) синтеза не наблюдается. На основании этих данных можно предположить, что в обезьяньих клетках синтез мРНК фибриллы блокируется в ядре, а цитоплазма обезьяньих клеток может полностью обеспечивать трансляцию аденовирусной мРНК.

Хотя точный механизм abortивной репликации аденовирусов в клетках обезьян до конца не ясен, понятно, что блок можно преодолеть суперинфекцией SV40. Показано, что функции белка-помощника осуществляет большой Т-антиген SV40 [74, 148]. Более точно, с использованием мутантов было показано, что С-концевой домен Т-антигена SV40 является транс-действующим усиливающим фактором [74]. С помощью методов вирусной генетики был обнаружен другой путь преодоления блока репли-



кации аденовирусов в клетках CV1. При анализе группы мутантов аденовирусов с увеличенной продукцией вируса в клетках CV1 [154] выяснилось, что мутации этих *hr*-мутантов картируются в N-конце DBP. Они отличаются от мутантов, несущих изменения в С-конце DBP, оказывающие значительное влияние на репликацию вируса [84, 155, 159]. Общим свойством Т-антигена SV40 и DBP аденовируса является их способность связываться с нуклеиновыми кислотами, однако если Т-антиген SV40 связывается с двухцепочечными ДНК [301], то DBP предпочитает одноцепочечные домены. По-видимому, в их первичной структуре нет никакой гомологии.

### Гибридные вирусы

При внутримолекулярной рекомбинации различные количества ДНК SV40 встраиваются в аденовирусную ДНК с делециями разной протяженности. Первыми выделили гибриды между Ad7 и SV40, которые оказались дефектными, поскольку делеции в ДНК аденовируса затронули жизненно важные участки; в связи с этим для продуктивного заражения гибридом Ad7—SV40 необходим вирус-помощник — интактный Ad7 [13, 169a, 257]. Позднее были выделены рекомбинанты между Ad2 и SV40, у которых были значительные делеции последовательности аденовирусной ДНК и которые также нуждались в вирусе-помощнике для репликации. Среди таких рекомбинантов были Ad HEY (высокоурожайные) и Ad LEY (низкоурожайные). Создается впечатление, что рекомбинанты с SV40 могут образовывать все серотипы аденовирусов [148].

Другая группа гибридных вирионов Ad—SV40 была недефектной (ND) при выращивании на клетках человека и не нуждалась в интактном вирусе-помощнике [148, 170]. У гибридов Ad2<sup>+</sup>ND<sub>1-5</sub> число бляшек прямо пропорционально концентрации вируса. Вставки последовательностей SV40 были небольшими, они не включали весь геном, но всегда содержали различные по протяженности участки, кодирующие С-конец большого Т-антигена [148, 206]. Возможно, эти пять гибридов Ad2—SV40 представляют собой результат одного акта рекомбинации и последующих множественных делеций и перестроек [148]. Последовательности SV40, содержащиеся в Ad2<sup>+</sup>ND<sub>1</sub>, Ad2<sup>+</sup>ND<sub>2</sub> и Ad2<sup>+</sup>ND<sub>4</sub>, оказались достаточными для поддержания оптимального роста вируса в клетках обезьян. На примере Ad2<sup>+</sup>ND<sub>1-5</sub>-рекомбинантов видно, что небольшой участок между 79,6 и 85,5 ед. карты аденовируса может быть заменен без потери жизнеспособности в культуре ткани. Этот участок, соответствующий ранним транскриптам ЕЗ, был назван «несущественным» для роста в культуре ткани, однако он может быть важным для иммунного узна-

вания в клетках зараженных животных, как описано выше в разделе «Ранние белки» [160, 224]. Вставка SV40 расположена в ДНК Ad2+ND<sub>2</sub> вслед за сильным промотором, который обеспечивает продукцию Т-антигена в гораздо больших количествах, чем при заражении интактным вирусом SV40. Поэтому в качестве источника Т-антигена используется именно Ad2+ND<sub>2</sub> [301]. Известна нуклеотидная последовательность, соединяющая ДНК Ad и SV40; она включает в себя эндорибонуклеазный сайт ААТААА и сайт полиаденилирования мРНК ЕЗ справа от вставки ДНК SV40 [302].

### Генетика вирусов

Генетика аденовирусов внесла значительный вклад в наше понимание механизмов репликации вируса. Многие из мутантов уже обсуждались при описании этапов репликации, изменяющихся в результате мутации. В этом разделе обобщена и расширена информация о мутантах аденовирусов.

### Получение мутантов аденовирусов

Обычно методики, используемые для получения мутантов, включают классические подходы мутагенеза и отбора вариантов при репродукции вируса. Однако в последнее время широко применяется метод сайт-специфического мутагенеза, позволяющий с высокой точностью изменять выбранные последовательности и функции. Условно-летальные температурочувствительные мутанты аденовирусов получают в результате воздействия сублетальных доз УФ-света, нитрозогуанидина, азотистой кислоты, гидроксимочевины [68, 332]. Мутанты по кругу хозяев (*hr*) отбирают по ограниченному росту на клетках HeLa при нормальном размножении в клетках 293 [101, 111]. Как уже указывалось выше, клетки 293 — это трансформированная линия клеток почки эмбриона человека со стабильно интегрированным участком аденовирусной ДНК, комплементирующим дефекты левой конечной части вирусного генома (0—11 ед. карты). Девять первоначальных *hr*-мутантов Ad5 были разделены на две комплементационные группы. Мутанты группы I, мутации в которых локализуются в *Hpa* I-фрагменте Е, росли только на клетках 293 и не росли на клетках HeLa, НЕК и хомячка. При заражении этими мутантами не синтезируется вирусная ДНК в клетках HeLa и НЕК, но ДНК этих мутантов была практически так же инфекционна в этих клетках, как и ДНК вируса дикого типа. По-видимому, мутация затрагивает функции раздевания. Повреждения ДНК *hr*-мутантов группы II картируются между 6 и 9,5 ед. карты. Эти мутанты в клетках HeLa и НЕК не синтезируют ни

вирусной ДНК, ни Т-антигена. Кроме того, они не трансформируют клетки хомячка, а их очищенная ДНК не инфекционна.

В заранее выбранный район мутации вносят методом сайт-специфического мутагенеза [141]. Например, ДНК Ad5 содержит два сайта рестрикции *Eco* RI. Тремя фрагментами, образующимися в результате гидролиза ДНК Ad5 рестриктазой *Eco* RI, трансфицировали перmissive клетки. С помощью этой процедуры отбирали предсуществующие мутанты Ad5, в которых отсутствовал один из *Eco* RI-сайтов. В потомстве с высокой частотой встречались мутанты, у которых в районе 83 ед. карты не было *Eco* RI-сайта, поскольку воссоединение двух фрагментов значительно более вероятно, чем трех. Первоначально с помощью такого подхода были получены мутанты, содержащие изменения в области, несущественной для размножения аденовируса в культуре ткани. Затем была получена группа делеционных мутантов, содержащих делеции в левом конце генома — трансформирующей области (E1A и E1B). Отбор проводили по способности мутировавшего потомства расти в клетках линии 293 [141]. Путем ступенчатого отбора удалось получить аденовирус типа 5 только с одним сайтом для рестриктазы *Xba*I (3,85 ед. карты). После гидролиза посредством *Xba*I с помощью нуклеазы S1 вносили делеции различного размера, включающие сайт рестрикции. Образующиеся фрагменты ДНК лигировали и трансфицировали ими клетки 293. Другой подход сайт-специфического мутагенеза заключался в следующем: выбранный участок-мишень вирусной ДНК клонировали в плазмиде и вносили мутации в вирусный фрагмент, встроенный в прокариотический вектор. После вырезания из плазмиды аденовирусную последовательность лигировали с остальной частью вирусного генома и получали ДНК, несущую мутацию в заранее выбранном месте [145].

### Картирование мутаций аденовирусов

Картирование случайных (спонтанных или полученных под действием мутагена) мутаций проводили с помощью различных методик. Первоначально применяли стандартное двухфакторное скрещивание, при котором для картирования *ts*-мутантов используется частота возникновения рекомбинантов, указывающая на относительные положения мутаций в геноме [58, 322, 333], а затем и рекомбинационное картирование в сочетании с ферментами рестрикции. Это стало возможным благодаря тому, что два серотипа аденовирусов, относящиеся к одной группе (табл. 28.1), обычно имеют различные рестрикционные карты, но рекомбинируют с частотой до 20%. Границы каждого родительского серотипа могут быть картированы довольно точно, если



два рекомбинанта имеют достаточно различающиеся рестрикционные карты. Такой подход неприменим для картирования аденовирусов, относящихся к различным группам, поскольку, как упоминалось выше, они не дают жизнеспособных рекомбинантов.

Методика спасения маркера была разработана для определения границ различных генов [6, 87]. Дефекты *ts*- или *hr*-мутанта комплементируют определенным фрагментом ДНК вируса дикого типа. Точность этого подхода зависит от доступности подходящих рестрикционных эндонуклеаз и возможности разделить нужные фрагменты ДНК; с его помощью уже получены новые важные данные и уточнены первоначальные *ts*-карты. Так, мутантный ген мутанта H5ts36Ad5, дефектного по синтезу ДНК, был картирован между 18,5 и 22 ед. карты; он полностью отделен от прилегающего домена (23—29 ед. карты), кодирующего белок, также необходимый для репликации ДНК (предшественник концевой белка) [94, 280]. Как было описано ранее, с помощью группы *ts*-мутантов было показано, что аденовирусная ДНК-полимераза действительно является продуктом вирусного гена [85].

### Картирование генов без мутантов

Существуют две методики для картирования генов, не требующие мутантов. Вирусную мРНК можно выделить гибридизацией с рестрикционным фрагментом аденовирусной ДНК и транслировать *in vitro*. Образующийся при этом полипептид либо закодирован в выбранном фрагменте ДНК, либо эта ДНК содержит лидерную последовательность, гомологичную данной вирусной мРНК [172—174].

Может быть использован и другой подход — блокировка трансляции гибридами (HART). Трансляция вирусных полипептидов *in vitro* может быть остановлена добавлением изолированного денатурированного фрагмента ДНК, гомологичного мРНК, кодирующей полипептид [227, 248]. Образование гибридов ДНК—РНК блокирует трансляцию выбранной мРНК. Использование описанных методов и их комбинаций позволило картировать кодирующие зоны структурных и неструктурных полипептидов аденовирусов (рис. 28.11).

### *ts*-Мутанты Ad5

Для обозначения этих мутантов принята стандартная номенклатура, включающая указание на источник выделения (*H* от human), на исходный серотип аденовируса (*H5*), на *ts*-дефект (*H5ts*) и, наконец, на номер мутанта (*H5ts36*). Среди примерно 100 изолированных *ts*-мутантов выделено 17 групп комплементации [97, 333]. Многие из этих мутантов уже обсуждались. Од-

нако заслуживает внимания тот факт, что первоначально схема классификации была основана на влиянии *ts*-мутаций на экспрессию различных антигенов капсида, а не на синтез самих вирусных полипептидов. Многие из сывороток, использованных в этих исследованиях, не способны реагировать с несобранными вирусными полипептидами. При дальнейшем изучении этих мутантов оказалось, что дефектный по антигену гексона вирион *H5ts17* даже не содержал мутации в гене гексона [36, 179, 220]. Мутация находилась в гене полипептида 100K, который принимает участие в сборке тримеров гексона. Мутант *H5ts149* из группы комплементации II был определен как мутант, у которого не синтезируются антигены капсида. Однако оказалось, что этот мутант дефектен по синтезу вирусной ДНК, который является необходимым этапом вирусного цикла перед началом поздней фазы — синтеза структурных полипептидов [68]. Несмотря на то что благодаря использованию новых подходов в первоначальную классификацию были внесены значительные изменения, эта классификация оказалась полезной при установлении основ изучения *ts*-мутантов Ad5.

### *ts*-Мутанты Ad2

Серотип Ad2 очень хорошо изучен биохимическими и физическими методами, однако его *ts*-мутанты не выделяли до тех пор, пока не была получена значительная информация о *ts*-мутантах Ad5. К счастью, рекомбинация между геномами Ad2 и Ad5 происходит легко, и они являются взаимозаменяемыми для комплементационного анализа и *in vivo*, и *in vitro*. Мутанты Ad2 дали дополнительную информацию к уже полученной ранее для *ts*-мутантов Ad5. В мутанте *H2ts1*, выращенном при непермиссивной температуре (39°), не происходило нарезания ни одного из предшественников pVI, pVII, pVIII и pTP до размера зрелых полипептидов [21]. Вирион собирался, но был неинфекционным. Вирион *H2ts1* (при 39°C) представлял собой «молодой» вирион, который обычно обнаруживают короткое время в качестве промежуточного продукта при заражении вирусом дикого типа [138a]. Существуют два *ts*-мутанта, дефектных по синтезу ДНК (*H2ts206* и *H2ts214*), которые комплементируют и с мутантами по гену N (*H5ts149*, *H5ts36*), и с мутантами по гену Q (*H5ts125*, *H5ts107*) Ad5. *H2ts206* не синтезирует вирусной мРНК, т. е. блок репродукции происходит, видимо, задолго до начала синтеза ДНК [146]. *H2ts214* также дефектен по синтезу ДНК и, возможно, является тем неуловимым мутантом, который необходим для исследования предшественника концевой белка — одного из трех вирусных полипептидов, участвующих в синтезе ДНК.

## Мутанты других серотипов

Проделана значительная работа по выделению мутантов Ad12 [164, 189]. Некоторые первоначально выделенные изоляты получили название *cyt*, что указывало на изменение морфологии бляшек; для этих мутантов характерно также изменение частоты трансформации [291, 292]. Однако эти мутанты мало охарактеризованы, и их молекулярные дефекты неизвестны. Выделена группа *ts*-мутантов Ad12 и определены некоторые генетические и биохимические характеристики этих изолятов [164, 189, 271, 290]. Выделены три группы комплементации с дефектами синтеза ДНК, и одна из них охарактеризована как дефектная по вирусному DBP [254, 290]. Так как Ad12 высоко онкогенен для грызунов, очень интересна более подробная характеристика этого серотипа. Необходима также дальнейшая характеристика мутантов Ad31, хотя биохимическое изучение этой группы и затруднено из-за более низкой продукции вирусов группы А по сравнению с группой С.

## Литература

1. Aleström P., Akusjarvi G., Pettersson M., Pettersson U. (1982). DNA sequence analysis of the region encoding the terminal protein and the hypothetical *N*-gene product of adenovirus type 2, J. Biol. Chem., **257**, 13492—13498.
2. Anderson C. W., Baum P. R., Gesteland R. F. (1973). Processing of adenovirus 2 induced proteins, J. Virol., **12**, 241—252.
3. Anderson K. P., Klessing D. F. (1983). Post-transcriptional block to synthesis of a human adenovirus capsid protein in abortively infected monkey cells, J. Mol. Appl. Genet., **2**, 31—43.
4. Arens M., Yamashita T. (1978). In vitro termination of adenovirus DNA synthesis by a soluble replication complex, J. Virol., **25**, 698—702.
5. Ariga H., Klein H., Levine A. J., Horwitz M. S. (1980). A cleavage product of the adenovirus DNA binding protein is active in DNA replication in vitro, Virol., **101**, 307—310.
6. Arrand J. E. (1978). Mapping of adenovirus type 5 temperature-sensitive mutations by marker rescue in enhanced double DNA infections. (Analysis of adenovirus gene function using DNA infection techniques.) J. Gen. Virol., **41**, 573—586.
7. Arrand J. R., Roberts R. J. (1979). The nucleotide sequences at the termini of adenovirus 2 DNA, J. Mol. Biol., **128**, 577—594.
8. Babich A., Nevins J. R. (1981). The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the viral 72 kd DNA binding protein, Cell, **26**, 371—379.
9. Babich A., Feldman L. T., Nevins J. R., Weinberger C., Darnell J. E. (1983). The effect of adenovirus infection on the appearance and translation of host cell mRNA, Mol. Cell. Biol., **3**, 1212—1221.
10. Bachenheimer S., Darnell J. E. (1975). Adenovirus 2 mRNA is transcribed as part of a high molecular weight precursor RNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 4445—4449.
11. Baker C. C., Ziff E. B. (1981). Promoters and heterogeneous 5' termini of the messenger RNAs of adenovirus serotype 2, J. Mol. Biol., **149**, 189—221.
12. Baum S. G. (1984). Adenoviridae. In: Principles and Practice of Infectious Diseases (2d ed.), ed. by G. L. Mandel, R. G. Douglas, and J. E. Bennett, Wiley, New York (in press).



13. Baum S. G., Horwitz M. S., Maizel J. V. (1972). Studies on the mechanism of enhancement of human adenovirus infection in monkey cells by SV40, *J. Virol.*, **10**, 211—219.
14. Bellett A. J. D., Younghusband H. B. (1972). Replication of the DNA of chick embryo lethal orphan virus, *J. Mol. Biol.*, **72**, 691—709.
15. Beltz G. A., Flint S. J. (1979). Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection, *J. Mol. Biol.*, **131**, 353—373.
16. Berget S. M., Moore C., Sharp P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3171—3175.
17. Berk A. J., Sharp P. A. (1977). Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease digested hybrids, *Cell*, **12**, 721—732.
18. Berk A. J., Sharp P. A. (1977). UV mapping of the adenovirus 2 early promoters, *Cell*, **12**, 45—55.
19. Berk A. J., Lee F., Harrison T., Williams J., Sharp P. A. (1979). Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs, *Cell*, **17**, 935—944.
20. Bernards R., Schrier P. I., Houweling A., Bos J. L., van der Eb A. J., Zijlstra M., Melief C. J. M. (1983). Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity, *Nature (Lond.)*, **305**, 776—779.
- 20a. Beyer A. L., Bouton A. H., Hodge L. D., Miller Jr., O. L. (1981). Visualization of the major late R strand transcription unit of adenovirus serotype 2, *J. Mol. Biol.*, **147**, 269—295.
21. Bhatti A. R., Weber J. (1979). Protease of adenovirus type 2. Subcellular localization, *J. Biol. Chem.*, **254**, 12265—12268.
22. Blanton R., Carter T. (1979). Autoregulation of adenovirus type 5 early gene expression. III. Transcription studies in isolated nuclei, *J. Virol.*, **29**, 458—465.
23. Bodner J. W., Pearson G. D. (1980). Kinetics of adenovirus DNA replication. I. Rate of adenovirus DNA replication, *Virology*, **100**, 208—221.
24. Bonifas V., Schlesinger R. W. (1959). Nutritional requirement for plaque production by adenovirus, *Fed. Proc.*, **18**, 560.
25. Brison O., Keding C., Chambon P. (1979). Adenovirus DNA template for late transcription is not a replicative intermediate, *J. Virol.*, **32**, 91—97.
26. Brison O., Keding C., Wilhelm J. (1977). Enzymatic properties of viral replication complexes isolated from adenovirus type 2 infected HeLa cell nuclei, *J. Virol.*, **24**, 423—435.
27. Broker T. R. (1984). Animal virus RNA processing. In: *Processing of RNA*, ed. by D. Apirion, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- 27a. Broker T. R., Chow L. (1981). In: *DNA tumor Viruses: Molecular Biology of Tumor Viruses*, 2nd edn., revised ed. by J. Tooze, pp. 408—409, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 27b. Broker T. R., Keller C. C., Roberts R. J. (1984). Human adenovirus serotypes 2, 4, 8, 40 and 41 and adenovirus-simian virus 40 hybrids. In: *Genetic Maps*, vol. 3, ed. by Stephen J. O'Brien, pp. 99—110, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
28. Brown D. T., Westphal M., Burlingham B. T., Wintrhoff U., Doerfler W. (1975). Structure and composition of the adenovirus type 2 core, *J. Virol.*, **16**, 366—387.
29. Brown M., Weber J. (1980). Virion core-like organization of intranuclear adenovirus chromatin late in infection, *J. Virol.*, **107**, 306—310.
30. Burlingham B. T., Doerfler W. (1971). Three size classes of intracellular adenovirus DNA, *J. Virol.*, **7**, 707—719.
31. Burlingham B. T., Doerfler W. (1972). An endonuclease in cells infected with adenovirus and associated with adenovirions, *Virology*, **48**, 1—13.

32. *Carter T., Blanton R.* (1978). Autoregulation of adenovirus 5 early gene expression. II. Effect of temperature sensitive early mutations on virus RNA accumulation, *J. Virol.*, **28**, 450—456.
33. *Carter T. H., Ginsberg H. S.* (1976). Viral transcription in KB cells infected by temperature sensitive early mutants of adenovirus type 5, *J. Virol.*, **18**, 156—166.
34. *Celma M. L., Pan J., Weissman S.* (1977). Studies of low molecular weight RNA from cells infected with adenovirus 2. I. The sequence at the 3' end of VA-RNA, *J. Biol. Chem.*, **252**, 9032—9042.
35. *Celma M. L., Pan J., Weissman S.* (1977). Studiet of low molecular weight RNA from cells infected with adenovirus 2. II. Heterogeneity at the 5' end of VA-RNA, *J. Biol. Chem.*, **252**, 9043—9046.
36. *Cepko C. L., Sharp P. A.* (1983). Analysis of Ad5 hexon and 100k ts mutants using conformation-specific monoclonal antibodies, *Virology*, **129**, 137—154.
37. *Challberg M. D., Kelly T. J., Jr.* (1979). Adenovirus DNA replication in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 655—659.
38. *Challberg M. D., Kelly T. J., Jr.* (1981). Processing of the adenovirus terminal protein, *J. Virol.*, **38**, 272—277.
39. *Challberg M. D., Desiderio S. V., Kelly T. J., Jr.* (1980). Adenovirus DNA replication in vitro, Characterization of a protein covalently linked to nascent DNA strands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5105—5109.
40. *Challberg M. D., Ostrove J. M., Kelly T. J., Jr.* (1982). Initiation of adenovirus DNA replication: Detection of covalent complexes between nucleotide and the 80-kilodalton terminal protein, *J. Virol.*, **41**, 265—270.
41. *Chardonnet Y., Dales S.* (1970). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome, *Virology*, **40**, 462—477.
42. *Chardonnet Y., Dales S.* (1970). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. II. Comparative observations on the penetration of types 1, 5, 7 and 12, *Virology*, **40**, 478—485.
43. *Chardonnet Y., Dales S.* (1972). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa Cells. III. Relationship between an ATPase activity in nuclear envelopes and transfer of core material. A hypothesis, *Virology*, **48**, 342—359.
44. *Chow L. T., Broker T. R.* (1978). The spliced structures of adenovirus-2 fiber message and the other late mRNAs, *Cell*, **15**, 497—510.
- 44a. *Chow L. T., Broker T. R.* (1980). The elucidation of RNA splicing in the adenoviral system. In: *Gene Structure and Expression*, ed. by L. E. Johnson, P. C. Kimball, and P. S. Perlman, Ohio State University Press, Columbus, Ohio.
45. *Chow L. T., Broker T. R.* (1981). Mapping RNA: DNA heteroduplexes by electron microscopy. In: *Electron Microscopy in Biology*, Vol. 1, ed. by Jack D. Griffin, pp. 139—188, John Wiley and Sons, New York.
46. *Chow L. T., Broker T. R., Lewis J. B.* (1979). Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2, *J. Mol. Biol.*, **134**, 265—303.
47. *Chow L., Lewis J. B., Broker T. R.* (1980). RNA transcription and splicing at early and intermediate times after adenovirus-2 infection, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 401—414.
48. *Chow L. T., Gelinas R. E., Broker T. R., Roberts R. J.* (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA, *Cell*, **12**, 1—8.
49. *Chow L. T., Roberts J. M., Lewis J. B., Broker T. R.* (1977). A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA: DNA hybrids, *Cell*, **11**, 819—836.

- 49a. Chow L. T., Engler J. A., Rossini M., Guilfoyle R. A., van Bree M. P., Broker T. R. (1983). The structure and regulation of early region 2 encoding the DNA replication functions of human adenoviruses. In: *Nucleic Acid Research Future Development*, ed. by K. Mizobuchi, I. Watanabe, and J. D. Watson, pp. 319—347, Academic Press, New York.
50. Commission on Acute Respiratory Disease (1947). Experimental transmission of minor respiratory illness to human volunteers by filter-passing agents. Demonstration of two types of illness characterized by long and short incubation periods and different clinical features, *J. Clin. Invest.*, 26, 957—973.
51. Gordon J., Engelking H. M., Pearson G. D. (1976). Chromatin-like organization of the adenovirus chromosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 401—404.
52. Craig E. A., Raskas H. J. (1974). Effect of cycloheximide on RNA metabolism early in productive infection with adenovirus 2, *J. Virol.*, 14, 26—32.
53. Dales S., Chardonnet Y. (1973). Early events in the interaction of adenovirus with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement in the inoculum, *Virology*, 56, 465—483.
54. Daniell E. (1976). Genome structure of incomplete particles of adenovirus, *J. Virol.*, 19, 685—708.
55. Daniell E., Fodor M. J. (1982). Transcription of adenovirus cores in vitro, Major RNA products differ from those made from a DNA template, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1834—1838.
56. deJong J. C., Wigand R., Kidd A. H., Wadell G., Kapsenberg J. G., Muzeirie C. J., Wermenbol G. A., Firtzlaff R. G. (1983). Candidate adenoviruses 40 and 41: Fastidious adenoviruses from human infant stool, *J. Med. Biol.*, 2, 215—231.
57. de Jong P. J., Valderrama G., Spigland I., Horwitz M. S. (1983). Adenovirus isolates from urine of patients with acquired immunodeficiency syndrome, *Lancet*, 1, 1293—1296.
58. D'Halluin J. C., Martin G. R., Torpier G., Boulanger P. A. (1978). Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates, *J. Virol.*, 26, 357—363.
59. D'Halluin J. C., Milleville M., Boulanger P. A., Martin G. R. (1978). Temperature sensitive mutant of adenovirus type 2 blocked in virion assembly: Accumulation of light intermediate particles, *J. Virol.*, 26, 344—356.
60. Dijkema R., Dekker B. M. M. (1979). The inverted terminal repetition of the DNA of weakly oncogenic adenovirus type 7, *Gene*, 8, 7—15.
61. Dingle J., Langmuir A. D. (1968). Epidemiology of acute respiratory disease in military recruits, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 97, 1—65.
62. Doderlung J., Pettersson U., Vennstrom B., Philipson L., Mathews M. B. (1976). A new species of virus-coded low molecular weight RNA from cells infected with adenovirus type 2, *Cell*, 7, 585—593.
63. Doerfler W., Kleinschmidt A. (1970). Denaturation pattern of the DNA of adenovirus type 2 as determined by electron microscopy, *J. Mol. Biol.*, 50, 579—593.
64. Early P., Rogers J., Doors M., Calame K., Bond M., Wall R., Hood L. (1980). Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin  $\mu$  gene by alternative RNA processing pathways, *Cell*, 20, 313—319.
65. Eggerding F., Raskas H. J. (1978). Effect of protein synthesis inhibitors on viral mRNAs synthesized early in adenovirus type 2 infection, *J. Virol.*, 25, 453—458.
66. Enders J. F., Bell J. A., Dingle J. H., Francis T., Jr., Hilleman M. R., Huebner R. J., Payne A. M. M. (1956). «Adenoviruses»: Group name proposed for new respiratory-tract viruses, *Science*, 124, 119—120.



- 66a. Engler J. A., Hoppe M. S., van Bree M. P. (1983). The nucleotide sequence of the genes encoded in early region 2b of human adenovirus type 7, *Gene*, **21**, 145—159.
67. Enomoto T., Lichy J. H., Ikeda J., Hurwitz J. (1981). Adenovirus DNA replication in vitro: Purification of the terminal protein in a functional form, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6779—6783.
68. Ensinger M. J., Ginsberg H. S. (1972). Selection and preliminary characterization of temperature sensitive mutants of type 5 adenovirus, *J. Virol.*, **10**, 328—339.
69. Eron L., Westphal H., Khoury G. (1975). Post-transcription restriction of human adenovirus expression in monkey cells, *J. Virol.*, **15**, 1256—1261.
70. Evans R., Weber J., Ziff E., Darnell J. E. (1979). Premature termination during adenovirus transcription, *Nature (Lond.)*, **278**, 367—370.
71. Everitt E., Lutter L., Philipson L. (1975). Structural proteins of adenoviruses. XII. Location and neighbor relationship among proteins of adenovirus type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking, *Virology*, **67**, 197—208.
72. Everitt E., Sundquist B., Pettersson U., Philipson L. (1973). Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2, *Virology*, **62**, 130—147.
73. Farber M. S., Baum S. G. (1978). Transcription of adenovirus RNA in permissive and nonpermissive infections, *J. Virol.*, **27**, 136—148.
74. Fey G., Lewis J. B., Grodzicker T., Bothwell A. (1979). Characterization of a fused protein specified by the adenovirus type 2-simian virus 40 hybrid Ad2+ND1 dp2, *J. Virol.*, **30**, 201—217.
75. Feldman L. T., Imperiale M. J., Nevins J. R. (1982). Activation of early adenovirus transcription by the herpesvirus immediate early gene: Evidence for a common cellular factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4952—4956.
76. Fire A., Baker C. C., Manley J. L., Ziff E. B., Sharp P. A. (1981). In vitro transcription of adenovirus, *J. Virol.*, **40**, 703—719.
77. Flint S. J. (1982). Expression of adenoviral genetic information in productively infected cells, *Biochem. Biophys. Acta*, **651**, 175—208.
78. Flint S. J., Sharp P. A. (1976). Adenovirus transcription. V. Quantitation of viral RNA sequences in adenovirus 2 infected and transformed cells, *J. Mol. Biol.*, **106**, 749—771.
79. Foster D. A., Hantzopoulos P., Zubay G. (1982). Resistance of Adenoviral DNA replication to aphidicolin is dependent on the 72-kilodalton DNA-binding protein, *J. Virol.*, **143**, 679—686.
80. Fowlkes D. M., Shenk T. (1980). Transcriptional control regions of the adenovirus Val RNA gene, *Cell*, **22**, 405—413.
81. Fox R. I., Baum S. G. (1972). Synthesis of viral RNA during restricted adenovirus infection, *J. Virol.*, **10**, 220—227.
82. Fraser N. W., Baker C. C., Moore M. A., Ziff E. B. (1982). Poly(A) sites of adenovirus serotype 2 transcription units, *J. Mol. Biol.*, **155**, 207—233.
83. Friedman M. P., Lyons M. J., Ginsberg H. S. (1970). Biochemical consequences of type 2 adenovirus and SV40 double infections of African green monkey cells, *J. Virol.*, **5**, 586—597.
84. Friefeld B. R., Krevolin M. D., Horwitz M. S. (1983). Effects of the adenoviruses H5ts125 and H5ts107 DNA-binding protein on DNA replication in vitro, *Virology*, **124**, 380—389.
85. Friefeld B. R., Lichy J., Hurwitz J., Horwitz M. S. (1983). Evidence for an altered adenovirus DNA polymerase in cells infected with the mutant H5ts149, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1589—1593.
86. Friefeld B. R., Lichy J., Field J., Gronostajski R. M., Guggenheimer R. A., Krevolin M. D., Nagata K., Hurwitz J., Horwitz M. S. (1984). The in vitro

- replication of adenovirus DNA, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **110** (No. 2), 221—255.
87. Frost E., Williams J. W. (1978). Mapping temperature-sensitive and host-range mutants of adenovirus type 5 by marker rescue, *Virology*, **91**, 39—50.
  88. Gallimore P. H., Sharp P. A., Sambrook J. (1974). Viral DNA in transformed cells. II. A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in nine lines of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome, *J. Mol. Biol.*, **89**, 49—72.
  89. Galos R., Williams J., Binger M. H., Flint S. J. (1979). Location of additional early gene sequences in the adenoviral chromosome, *Cell*, **17**, 945—956.
  90. Garon C. F., Berry K. W., Rose J. A. (1972). A unique form of terminal redundancy in adenovirus DNA molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2391—2395.
  91. Garon C. F., Berry K. W., Hierholzer J. C., Rose J. A. (1973). Mapping of base sequence heterologies between genomes from different adenovirus serotypes, *Virology*, **54**, 414—426.
  92. Gélinas R. E., Roberts R. J. (1977). One predominant 5'-undecanucleotide in adenovirus 2 late messenger RNAs, *Cell*, **11**, 533—544.
  93. Gilead Z., Zeng Y. H., Word W. S. M., Sugawara K., Rho H. W., Harter M. L., Green M. (1976). Immunologic identification of two adenovirus 2-induced early proteins possibly involved in cell transformation, *Nature (Lond)*, **264**, 263—266.
  94. Gingeras T. L. R., Sciaky D., Gelinas R. E., Jiang B.-D., Yen C. E., Kelly M. M., Bullock P. A., Parsons B. L., O'Neill K. E., Robert R. J. (1982). Nucleotide sequences from the adenovirus 2 genome, *J. Biol. Chem.*, **257**, 13475—13491.
  95. Ginsberg H. S., Bello L. J., Levine A. J. (1967). Control of biosynthesis of host macromolecules in cells infected with adenovirus. In: *The Molecular Biology of Viruses*, ed. by J. S. Colter and W. Paranchych, pp. 547—572, Academic Press, New York.
  96. Ginsberg H. S., Pereira H. G., Valentine R. C., Wilcox W. C. (1966). A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits, *Virology*, **28**, 782—783.
  97. Ginsberg H. S., Ensinger M. J., Kaufman R. S., Mayer A. J., Lundholm U. (1975). Cell transformation: A study of regulation with type 5 and 12 adenovirus temperature-sensitive mutants, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 419—426.
  98. Goldberg S., Weber J., Darnell J. E. (1977). The definition of a large transcription unit late in Ad2 infection of HeLa cells: Mapping by effects of ultraviolet irradiation, *Cell*, **10**, 617—621.
  99. Goldberg C. J., Addenberg C. T., Hauser S. D. (1983). Accurate and efficient in vitro splicing of purified precursor RNAs sequences of early region 2 of adenovirus 2 genome, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1337—1348.
  100. Goodhearst C. R. (1971). DNA density of oncogenic and non-oncogenic simian adenoviruses, *Virology*, **44**, 645—648.
  101. Graham F. L., Abrahams P. J., Mulder C., Heijneker H. L., Warnaar S. O., de Vries F. A. J., Fiers W., van der Eb A. J. (1974). Studies on in vitro transformation by DNA and DNA fragments of human adenoviruses and SV40, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 637—650.
  102. Green M. (1970). Oncogenic viruses, *Annu. Rev. Biochem.*, **39**, 701—766.
  103. Green M., Daesch G. E. (1961). Biochemical studies on adenovirus multiplication. I. Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures, *Virology*, **13**, 169—176.
  104. Green M., Piña M. (1963). Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus, *Virology*, **20**, 199—207.

105. Green M., Piña M., Kimes R. C. (1967). Biochemical studies on adenovirus multiplication. XII. Plaquing efficiencies of purified human adenoviruses, *Virology*, **31**, 562—565.
106. Green M., Piña M., Kimes R., Wensink P. C., MacHattie L. A., Thomas C. A. (1967). Adenovirus DNA. I. Molecular weight and conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 1302—1309.
107. Green M., Parsons J. T., Piña M., Fujinaga K., Caffer H., Langraf-Leurs M. (1971). Transcription of adenovirus genes in productively infected and in transformed cells, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 803—818.
- 107a. Green M., Wold M. S. M., Brackmann K. H., Cartas M. A., Sanders P. R., Olson K., Lee T. K., Young L., Matsuo T., Kapoor Q. (1980). Human adenovirus transforming genes: Group relationships, integration, expression in transformed cells and analysis of human cancers and tonsils. In: 7th Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation Viruses in Naturally Occurring Tumors, ed. by M. Essex, G. Todaro, and H. zur Hausen, pp. 373—397, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
108. Guggenheimer R. A., Nagata K., Field J., Lindinbaum J., Gronostajski R. M., Horwitz M. S., Hurwitz J. (1983). In vitro Synthesis of Full Length Adenoviral DNA. In: UCLA Symposia on Mechanisms of DNA Replication and Recombination, pp. 395—421, Alan R. Liss, New York.
- 108a. Guilfoyle R., Weinmann R. (1981). The control region for transcription of the adenovirus VA D-RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3378—3382.
109. Hammarshjold M. L., Winberg G. (1980). Encapsidation of adenovirus 16 DNA is directed by a small DNA sequence at the left end of the genome, *Cell*, **20**, 787—795.
110. Handa H., Kingston R. E., Sharp P. A. (1983). Inhibition of adenovirus early region IV transcription in vitro by a purified viral DNA binding protein, *Nature (Lond.)*, **302**, 545—547.
111. Harrison T., Graham F., Williams J. (1977). Host range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells, *Virology*, **77**, 319—329.
112. Harter M. L., Lewis J. B. (1978). Adenovirus type 2 early proteins synthesized in vitro and in vivo: Identification in infected cells of the 38,000 to 50,000 molecular weight protein encoded by left and of the adenovirus type 2 genome, *J. Virol.*, **26**, 736—747.
113. Harter M. L., Shanmugam G., Wold W. S., Green M. (1976). Detection of adenovirus type 2-induced early polypeptides using cycloheximide pretreatment to enhance viral protein synthesis, *J. Virol.*, **19**, 232—242.
114. Hartley J. W., Huebner R. J., Rowe W. P. (1956). Serial propagation of adenoviruses (APC) in monkey kidney tissue cultures, *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, **92**, 667—669.
115. Hashimoto S., Pursley M. H., Green M. (1981). Nucleotide sequences and mapping of novel heterogenous 5' termini of adenovirus 2 early region 4 mRNA, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 1675—1689.
116. Hashimoto S., Wold W. S. M., Brackmann K. H., Green M. (1981). Nucleotide sequences of 5' termini of adenovirus 2 early transforming region E1a and E1b messenger ribonucleic acids, *Biochemistry*, **20**, 6640—6647.
117. Hennache B., Boulanger P. (1977). Biochemical study of KB cell receptor for adenovirus, *Biochem. J.*, **166**, 237—247.
118. Hierholzer J. C. (1973). Further subgrouping of the human adenoviruses by differential hemagglutination, *J. Infect. Dis.*, **128**, 541—550.
119. Hilleman M. R., Werner J. H. (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness, *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **85**, 183—188.
120. Hodge L. D., Scharff M. D. (1969). Effect of adenovirus on host cell DNA synthesis in synchronized cells, *Virology*, **37**, 554—564.
121. Hogan M. J., Crawford J. W. (1942). Epidemic keratoconjunctivitis (superficial punctate keratitis, keratitis subepithelialis, keratitis maculosa, keratitis nummularis), *Am. J. Ophthalmol.*, **25**, 1059—1078.



122. Horne R. W., Bonner S., Waterson A. P., Wildy P. (1959). The icosahedral form of an adenovirus, *J. Mol. Biol.*, **1**, 84—86.
123. Horwitz M. S. (1971). Intermediates in the replication of type 2 adenovirus DNA, *Virology*, **8**, 675—683.
124. Horwitz M. S. (1974). Location of the origin of DNA replication of adenovirus type 2, *J. Virol.*, **13**, 1046—1054.
125. Horwitz M. S. (1976). Bidirectional replication of adenovirus type 2 DNA, *J. Virol.*, **18**, 307—315.
126. Horwitz M. S. (1978). Temperature-sensitive replication of H5ts125 adenovirus DNA in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4291—4295.
127. Horwitz M. S., Ariga H. (1981). Multiple rounds of adenovirus DNA synthesis in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1476—1480.
128. Horwitz M. S., Brayton C., Baum S. G. (1973). Synthesis of type 2 adenovirus DNA in the presence of cycloheximide, *J. Virol.*, **11**, 544—551.
129. Horwitz M. S., Maizel J. V., Jr., Scharff M. D. (1970). Molecular weight of adenovirus type 2 hexon polypeptide, *J. Virol.*, **6**, 569—571.
130. Horwitz M. S., Scharff M. D., Maizel J. V., Jr. (1969). Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres and morphogenesis of the virion, *Virology*, **39**, 682—684.
131. Horwitz M. S., Kaplan L. M., Abboud M. M., Maritano J. C., Chow L. T., Broker T. R. (1979). Adenovirus DNA replication in soluble extracts of infected cell nuclei, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 769—780.
132. Hosakawa K., Sung M. T. (1976). Isolation and characterization of an extremely basic protein from adenovirus type 5, *J. Virol.*, **17**, 924—934.
133. Huebner R. J., Casey M. J., Chanock R. M., Schell K. (1965). Tumors induced in hamsters by a strain of adenovirus type 3. Sharing of tumor antigens and «neoantigens» with those produced by adenovirus type 7 tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 381—388.
134. Huebner R. J., Chanock R. M., Rubin B. A., Casey M. J. (1964). Induction by adenovirus type 7 of tumors in hamsters having the antigenic characteristics of SV40 virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 1333—1340.
135. Huebner R. J., Rowe W. P., Turner H. C., Lane W. T. (1963). Specific adenovirus complement fixing antigens in virus-free hamster and rat tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 379—389.
136. Huebner R. J., Rowe W. P., Ward T. G., Parrott R. H., Bell J. A. (1954). Adenoidal-pharyngeal conjunctival agents, *N. Engl. J. Med.*, **251**, 1077—1086.
137. Ikeda J. E., Enomoto T., Hurwitz J. (1981). Replication of adenovirus DNA protein complex with purified proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 884—888.
138. Ishibashi M., Maizel J. V., Jr. (1974). The polypeptides of adenovirus. V. Young virion, structural intermediates between top components and aged virions, *Virology*, **57**, 409—424.
- 138a. Ishibashi M., Maizel J. V., Jr. (1974). The polypeptides of adenovirus. VI. Early and late glycoproteins, *Virology*, **58**, 345—361.
139. Janik J. E., Huston M. M., Rose J. A. (1981). Location of adenovirus genes required for the replication of adenovirus-associated virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1925—1929.
140. Jawetz E. (1959). The story of shipyard eye, *Br. Med. J.*, **1**, 873—878.
141. Jones N., Shenk T. (1978). Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5, *Cell*, **13**, 181—188.
142. Jones N., Shenk T. (1979). An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3665—3669.
143. Kaplan L. M., Kleinman R. E., Horwitz M. S. (1977). Replication of adenovirus type 2 DNA in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4425—4429.

144. Kaplan L. M., Ariga H., Hurwitz J., Horwitz M. S. (1979). Complementation of the temperature-sensitive defect in H5ts125 adenovirus DNA replication in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5534—5538.
145. Kapoor A. S., Chinnadurai G. (1981). Method for introducing site specific mutations into adenovirus 2 genome; construction of a small deletion mutant in VA-RNA<sub>1</sub> gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2184—2188.
146. Kathmann P., Schick J., Winnacker E. L., Doerfler W. (1976). Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of adenovirus 2, *J. Virol.*, **19**, 43—53.
147. Keding C., Brison O., Perrin F., Wilhelm J. (1978). Structural analysis of replicative intermediates from adenovirus type 2 infected HeLa cell nuclei, *J. Virol.*, **26**, 364—379.
148. Kelly T. J., Jr., Lewis A. M. (1973). Use of nondefective adenovirus-simian virus 40 hybrids for mapping the simian virus 40 genome, *J. Virol.*, **12**, 643—652.
149. Kitchingman G. R. (1982). Restriction mapping and molecular cloning of adenovirus type 4 (subgroup E) DNA, *Gene*, **20**, 205—210.
150. Klein H., Maltzman W., Levine A. J. (1979). Structure function relationships of the adenovirus DNA-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **254**, 11051—11060.
151. Klessig D. F. (1977). Two adenovirus mRNAs have a common 5' terminal leader sequence encoded at least 10kb upstream from their main coding regions, *Cell*, **12**, 9—21.
152. Klessig D. F., Anderson C. W. (1975). Block to multiplication of adenovirus serotype 2 in monkey cells, *J. Virol.*, **16**, 1650—1668.
153. Klessig D. F., Chow L. T. (1980). Incomplete splicing of several late viral mRNAs in monkey cells infected by human adenovirus type 3, *J. Mol. Biol.*, **139**, 221—242.
154. Klessig D. F., Grodzicker T. (1979). Mutations that allow human Ad2 and Ad5 to express late genes in monkey cells map in the viral gene encoding the 72K DNA-binding protein, *Cell*, **17**, 957—966.
155. Klessig D. F., Quinlan M. P. (1982). Genetic evidence for separate functional domains of the human adenovirus specified, 72K, DNA-binding protein, *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 263—272.
- 155a. Klessig D. F., Quinlan M. P., Grodzicker T. (1982). Proteins containing only half of the coding information of early region 1B of adenovirus are functional in human cells transformed with the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene and adenovirus type 2 DNA, *J. Virol.*, **41**, 423—434.
156. Krevolin M., Horwitz M. S. Personal observations.
157. Kruijer W., van Schaik F. M. A., Sussenbach J. S. (1981). Structural organization of the gene coding for the DNA binding protein of adenovirus type 5, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 4439—4457.
158. Kruijer W., Schaik F. M. A., Sussenbach J. S. (1982). Nucleotide sequence of the gene encoding adenovirus type 2 DNA-binding protein, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 4493—4500.
159. Kruijer W., Nicolas J. C., van Schaik F. M. A., Sussenbach J. S. (1983). Structure and function of DNA-binding proteins from revertants of adenovirus type 5 mutants with a temperature sensitive DNA replication, *Virology*, **124**, 425—433.
160. Kvist S., Ostberg L., Persson H., Philipson L., Peterson P. A. (1978). Molecular association between transplantation antigens and a cell surface antigen in an adenovirus transformed cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5674—5678.
161. Kwant M. M., van der Vliet P. C. (1980). Differential effect of aphidicolin on adenovirus DNA synthesis and cellular DNA synthesis, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 3993—4007.

162. Laver W. G., Suriano J. R., Green M. (1967). Adenovirus proteins. II. N-terminal amino acid analysis, *J. Virol.*, **1**, 723—728.
163. Lechner R. L., Kelly T. J., Jr. (1977). The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules, *Cell*, **12**, 1007—1020.
164. Ledinko N. (1974). Temperature sensitive mutants of adenovirus type 12 defective in viral DNA synthesis, *J. Virol.*, **14**, 457—468.
165. Lerner M. R., Steitz J. A. (1979). Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5495—5499.
- 165a. Lerner M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. L., Steitz J. A. (1979). Are smRNAs involved in splicing? *Nature (Lond.)*, **283**, 220—224.
- 165b. Levine A. J. (1984). The adenovirus early proteins, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **110** (No. 2), 143—167.
166. Levine A. J., Ginsberg H. S. (1967). Mechanism by which fiber antigen inhibits multiplication of type 5 adenovirus, *J. Virol.*, **1**, 747—757.
167. Levine A. J., van der Vliet P. C., Sussenbach J. (1976). The replication of papovirus and adenovirus DNA, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **73**, 67—124.
168. Levine A. J., van der Vliet P. C., Rosenwirth B., Rabek J., Frenkel G., Ensinger M. (1975). Adenovirus-infected cell-specific DNA-binding proteins, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 559—566.
169. Levinson A., Levine A. J., Anderson S., Osborn M., Rosenwirth B., Weber K. (1976). The relationship between group C adenovirus tumor antigen and the adenovirus single-strand DNA-binding protein, *Cell*, **7**, 575—584.
- 169a. Lewis A. M., Jr., Baum S. G., Prigge K. O., Rowe W. P. (1966). Occurrence of adenovirus SV40 hybrid among monkey kidney cell adapted strains of adenovirus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**, 214—218.
170. Lewis A. M., Levine A. S., Crumpacker C. S., Levin M. J., Samaha R. J., Henry P. H. (1973). Studies of nondefective adenovirus 2-SV40 specific biological properties, *J. Virol.*, **11**, 655—664.
171. Lewis J. B., Mathews M. (1980). Control of adenovirus early gene expression: A class of immediate early products, *Cell*, **21**, 303—313.
172. Lewis J. B., Anderson C. W., Atkins J. F. (1977). Further mapping of late adenovirus genes by cell-free translation of RNA selected by hybridization of specific DNA fragments, *Cell*, **12**, 37—44.
173. Lewis J. B., Atkins J. F., Anderson C. W., Baum P. R., Gesteland R. F. (1975). Mapping of late adenovirus genes by cell-free translation of RNA selected by hybridization to specific DNA fragments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1344—1348.
174. Lewis J. B., Atkins J. F., Baum P. R., Solem R., Gesteland R. F., Anderson C. W. (1976). Location and identification of the genes for adenovirus type 2 early polypeptides, *Cell*, **7**, 141—151.
175. Lichy J. H., Horwitz M. S., Hurwitz J. (1981). Formation of a covalent complex between the 80,000 dalton adenovirus terminal protein and 5' dCMP in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2678—2682.
176. Lichy J. H., Field J., Horwitz M. S., Hurwitz J. (1982). Separation of the adenovirus terminal protein precursor from its associated DNA polymerase: Role of both proteins in the initiation of adenovirus DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5225—5229.
177. Lichy J. H., Enomoto T., Field J., Friefeld B. R., Guggenheimer R. A., Ikeda J., Nagata K., Horwitz M. S., Hurwitz J. (1983). Isolation of proteins involved in the replication of adenovirus DNA in vitro, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 731—740.
178. Liebowitz J., Horwitz M. S. (1974). Synthesis and assembly of adenovirus type 2 polypeptides. II. Reversible inhibition of hexon assembly at 42°, *Virology*, **61**, 129—139.



179. *Leibowitz J., Horwitz N. S.* (1975). Synthesis and assembly of adenovirus polypeptides. III. Reversible inhibition of hexon assembly in adenovirus type 5 temperature-sensitive mutants, *Virology*, **66**, 10—24.
180. *Lindberg U., Persson T., Philipson L.* (1972). Isolation and characterization of adenovirus mRNA in productive infection, *J. Virol.*, **10**, 909—919.
181. *Linne' T., Jornvall H., Philipson L.* (1977). Purification and characterization of the phosphorylated DNA binding protein from adenovirus type 2 infected cells, *Eur. J. Biochem.*, **76**, 481—490.
182. *Lischwe M., Sung M. T.* (1977). A histone like protein from adenovirus chromatin. *Nature (Lond.)*, **267**, 552—555.
183. *Logan J., Nicolas J. C., Topp W. C., Girard M., Shenk T., Levine A. J.* (1981). Transformation by adenovirus early region 2A temperature-sensitive mutants and their revertants, *Virology*, **115**, 419—422.
184. *Londberg-Holm K., Philipson L.* (1969). Early events of virus-cell interactions in an adenovirus system, *J. Virol.*, **4**, 323—338.
185. *Longiaru M., Ikeda J.-E., Jakovsky Z., Horwitz S. B., Horwitz M. S.* (1979). The effect of aphidicolin on adenovirus DNA synthesis, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3369—3386.
186. *Lucas J. J., Ginsberg H. S.* (1971). Synthesis of virus-specific RNA in KB cells infected with type 2 adenovirus, *J. Virol.*, **8**, 203—213.
187. *Lucas J. J., Ginsberg H. S.* (1972). Transcription and transport of virus-specific RNAs in African green monkey cells abortively infected with type 2 adenovirus, *J. Virol.*, **10**, 1109—1117.
188. *Luftig R. B., Weihing R. R.* (1975). Adenovirus binds to rat brain microtubules in vitro, *J. Virol.*, **16**, 696—706.
189. *Lundholm U., Doerfler W.* (1971) Temperature-sensitive mutants of human adenovirus type 12, *Virology*, **45**, 827—829.
190. *McAllister R. M., Nicholson M. O., Reed G., Kern J., Gilden R. V., Huebner R. J.* (1969). Transformation of rodent cells by adenovirus 19 and other group D adenoviruses, *J. Natl. Cancer Inst.*, **43**, 917—922.
191. *Maizel J. V., Jr., White D. O., Scharff M. D.* (1968). The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7 and 12, *Virology*, **36**, 115—125.
192. *Maizel J. V., Jr., White D. O., Scharff M. D.* (1968). The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and structure of the virion, *Virology*, **36**, 126—136.
193. *Manley J., Fine A., Cano A., Sharp P. A., Gester M.* (1980). DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3855—3859.
194. *Martinez-Palomo A., Granboulan N.* (1967). Electron microscopy of adenovirus 12 replication. I. High resolution autoradiography of infected KB cells labeled with tritiated thymidine, *J. Virol.*, **1**, 1010—1018.
195. *Marusyk R. G., Morgan A. R., Wadell G.* (1975). Association of endonuclease activity with serotypes belonging to the three subgroups of human adenoviruses, *J. Virol.*, **16**, 456—458.
196. *Mathews M. B.* (1975). Genes for VA RNA in adenovirus 2, *Cell*, **6**, 223—229.
197. *Mathews M. B.* (1980). Binding of adenovirus VA RNA to mRNA: A possible role in splicing? *Nature (Lond.)*, **285**, 575—577.
198. *Matsuo T., Wold W. S. M., Hashimoto S., Rankin A., Symington J., Green M.* (1982). Polypeptides encoded by transforming region E1B of human adenovirus 2: Immunoprecipitation from transformed and infected cells and cell-free translation of E1B-specific mRNA, *Virology*, **118**, 456—465.
199. *McGuire P. M., Piatak M., Hodge L. D.* (1976). Nuclear and cytoplasmic adenovirus RNA. Differences between 5'-termini of messenger and non-messenger transcripts, *J. Mol. Biol.*, **101**, 379—396.

200. McGuire P. M., Stuart C., Hodge L. D. (1972). Adenovirus mRNA in mammalian cells: Failure of polyribosome association in the absence of nuclear cleavage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1578—1582.
201. McPherson R. A., Ginsberg H. S., Rose J. A. (1982). Adeno-associated virus helper activity of adenovirus DNA-binding protein, *J. Virol.*, **44**, 666—673.
202. Meissner H. C., Meyer J., Maizel J. V., Jr., Westphal H. (1977). Visualization and mapping of the late nuclear adenovirus RNA, *Cell*, **10**, 225—235.
203. Mirza M. A., Weber J. (1982). Structure of adenovirus chromatin, *Biochem. Biophys. Acta*, **696**, 76—86.
204. Montell C., Fisher E. F., Caruthers M. H., Berk A. J. (1982). Resolving the functions of overlapping viral genes by site-specific mutagenesis at a mRNA splice site, *Nature (Lond.)*, **295**, 380—384.
- 204a. Montell C., Fisher E. F., Caruthers M. H., Berk A. J. (1984). Inhibition of RNA cleavage but not polyadenylation by a point mutation in mRNA 3' consensus sequence AAUAAA, *Nature*, **305**, 600—605.
205. Morgan C., Rosenkranz H. S., Mednis B. (1969). Structure and development of viruses observed in the electron microscope, *J. Virol.*, **4**, 777—796.
206. Morrow J. F., Berg P., Kelly T. J., Jr., Lewis A. M., Jr. (1973). Mapping of simian virus 40 early functions on the viral chromosome, *J. Virol.*, **12**, 653—658.
207. Nagata K., Guggenheimer R. A., Hurwitz J. (1983). Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6177—6181.
208. Nagata K., Guggenheimer R. A., Enomoto T., Lichy J. H., Hurwitz J. (1982). Adenovirus DNA replicated in vitro: Identification of a host factor that stimulates the synthesis of the preterminal protein-dCMP complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6438—6442.
209. Nevins J. R. (1980). Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product, *Cell*, **26**, 213—220.
210. Nevins J. R. (1982). Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product, *Cell*, **29**, 913—919.
211. Nevins J. R., Darnell J. E. (1978). Steps in the processing of Ad2 mRNA poly(A)<sup>+</sup> nuclear sequences are conserved and poly(A) addition precedes splicing, *Cell*, **15**, 1477—1494.
212. Nevins J. R., Winkler J. J. (1980). Regulation of early adenovirus transcription: A protein product of early region 2 specifically represses region 4 transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1893—1897.
213. Nicolas J. C., Young C. S. H., Suarez F., Girard M., Levine A. J. (1983). Detection, rescue and mapping of mutations in the adenovirus DNA binding protein gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1674—1677.
214. Norrby E. (1966). The relationship between soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. I. Morphological characteristics, *Virology*, **28**, 236—248.
215. Norrby E. (1969). The relationship between soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. III. Immunologic characteristics, *Virology*, **37**, 565—576.
216. Norrby E., Bartha A., Boulanger P., Dreizen R., Ginsberg H. S., Kalter S. S., Kawamura H., Rowe W. P., Russell W. C., Schlessinger W., Wigand R. (1976). Adenoviridae, *Intervirology*, **7**, 117—125.
217. Numazaki Y., Kumasaka T., Yano N., Yamanaka M., Miyazawa T., Takai S., Ishida N. (1973). Further study of acute hemorrhagic cystitis due to adenovirus type II, *N. Engl. J. Med.*, **289**, 344—347.
218. Ohe K., Weissman S. M. (1970). Nucleotide sequence of an RNA from cells infected with adenovirus 2, *Science*, **167**, 879—880.

219. *Oosterom-Dragon E. A., Anderson C. W.* (1983). Polypeptide structure and encoding location of the serotype 2 adenovirus late, non structural 33K protein, *J. Virol.*, **45**, 251—263.
220. *Oosterom-Dragon E. A., Ginsberg H. S.* (1981). Characterization of two temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus with mutations in the 100,000 dalton protein gene, *J. Virol.*, **40**, 491—500.
221. *Osborne T. F., Berk A. J.* (1983). Far upstream initiation sites for adenovirus early region 1A transcription are utilized after the onset of viral DNA replication, *J. Virol.*, **45**, 594—599.
222. *Osborne T. F., Gaynor R. B., Berk A. J.* (1982). The TATA homology and the mRNA 5' untranslated sequence are not required for expression of essential adenovirus E1A functions, *Cell*, **29**, 139—148.
223. *Osborne T. F., Schell R., Burch-Jaffe E., Berget S., Berk A.* (1981). Mapping a eukaryotic promoter: A DNA sequence required for in vivo expression of adenovirus pre-early functions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1381—1384.
224. *Paabo S., Weber F., Kampe O., Schaffner W., Peterson P. A.* (1983). Association between transplantation antigens and a viral membrane protein synthesized from a mammalian expression vector, *Cell*, **35**, 445—453.
225. *Padgett R. A., Hardy S. F., Sharp P. A.* (1983). Splicing of adenovirus RNA in a cell-free transcription system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5230—5234.
226. *Padmanabhan R., Stabel S., Winterhoeft U., Doerfler W.* (1979). Specificity and mode of cleavage of the pH 4.0 endonuclease from adenovirus type 2 infected KB cells, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3161—3176.
227. *Paterson B. M., Roberts B., Kuff E. L.* (1977). Structural gene identification and mapping by DNA mRNA hybrid-arrested cell-free translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4370—4374.
- 227a. *Pawar S., Ahmed C. M. I., Watkins R., Zain S.* (1984). Efficient coupled transcription and mRNA splicing in vitro using plasmids derived from early region 3 of adenovirus 2 and a non-defective adenovirus-simian virus 40 hybrid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2679—2683.
228. *Pearson G. D., Hanawalt P. C.* (1971). Isolation of DNA replication complexes from uninfected and adenovirus-infected HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **62**, 65—80.
- 228a. *Persson H., Kvist S., Ostberg L., Petersson P. A., Philipson L.* (1979). Adenovirus early glycoprotein E3-19K and its association with transplantation antigens, *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 509—517.
229. *Persson H., Philipson L.* (1982). Regulation of adenovirus, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **97**, 157—203.
230. *Persson H., Pettersson U., Mathews M. B.* (1978). Synthesis of a structural adenovirus polypeptide in the absence of viral DNA replication, *Virology*, **90**, 67—79.
- 230a. *Persson H., Mathisen B., Philipson L., Pettersson U.* (1979). A maturation protein in adenovirus morphogenesis, *Virology*, **93**, 198—208.
231. *Pettersson U., Philipson L., Hoglund S. V.* (1968). Structural proteins of adenovirus. II. Purification and characterization of the adenovirus type 2 fiber antigen, *Virology*, **35**, 204—215.
232. *Philipson L., Lonberg-Holm K., Pettersson U.* (1968). Virus-receptor interaction in an adenovirus system, *J. Virol.*, **2**, 1064—1075.
233. *Philipson L., Pettersson U., Lindberg U.* (1975). Molecular biology of adenoviruses, *Virol. Monogr.*, **14**, 1—115.
234. *Piña M., Green M.* (1965). Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 547—551.
235. *Piña M., Green M.* (1968). Base composition of the DNA of oncogenic simian AdSA7 and homology with human adenovirus DNAs, *Virology*, **36**, 321.



236. Pina M., Green M. (1969). Biochemical studies on adenovirus multiplication. XIV. Macromolecule and enzyme synthesis in cells replicating oncogenic and non-oncogenic human adenoviruses, *Virology*, **38**, 573—586.
237. Pincus S., Robertson W., Rekosh D. (1981). Characterization of the effect of aphidicolin on adenovirus DNA replication: Evidence in support of a protein primer model of initiation, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 4919—4938.
238. Pope J. H., Rowe W. P. (1964). Immunofluorescent studies of adenovirus 12 tumors and of cells transformed or infected by adenoviruses, *J. Exp. Med.*, **120**, 577—587.
239. Prage L., Pettersson U., Hoglund S., Londberg-Holm K., Philipson L. (1970). Structural proteins of adenoviruses. IV. Sequential degradation of the adenovirus type 2 virion, *Virology*, **42**, 341—358.
240. Price R., Penman S. (1972). Transcription of the adenovirus genome by an  $\alpha$ -amanitin sensitive RNA polymerase in HeLa cells, *J. Virol.*, **9**, 621—626.
- 240a. Price R., Penman S. (1972). A distinct RNA polymerase activity synthesizing 5.5S and 4S RNA in nuclei isolated from adenovirus 2-infected HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **70**, 435—450.
241. Rabson A. S., O'Connor G. T., Berezsky I. K., Paul F. J. (1964). Enhancement of adenovirus growth in African green monkey kidney cell cultures by SV40, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **116**, 187—190.
242. Ralston R., Bishop J. M. (1983). The protein products of the *myc* and *myb* oncogenes and adenovirus E1A are structurally related, *Nature (Lond.)*, **306**, 803—806.
243. Rapp F., Melnick J. L., Butel J. S., Kitahara T. (1964). The incorporation of SV40 genetic material into adenovirus 7 as measured by intranuclear synthesis of SV40 tumor antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 1348—1352.
244. Raskas H. J., Thomas D. C., Green M. (1970). Biochemical studies on adenovirus multiplication. XVII. Ribosome synthesis in uninfected and infected KB cells, *Virology*, **40**, 893—902.
245. Reich P. R., Baum S. G., Rose J. A., Rowe W. P., Weissman S. M. (1966). Nucleic acid homology studies on adenovirus type 7-SV40 interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 336—341.
246. Rekosh D. M. K., Russell W. C., Bellet A. J. D., Robinson A. J. (1977). Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA, *Cell*, **11**, 283—295.
247. Rho H. M., Jeng Y. H., Wold W. M. S., Green M. (1977). Association of adenovirus type 2 early proteins with a soluble complex that synthesizes adenovirus DNA in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 422—428.
248. Ricciardi R. P., Miller J. S., Roberts B. E. (1979). Purification and mapping of specific mRNAs by hybridization-selection and cell-free translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4927—4931.
249. Ricciardi R. P., Jones R. L., Cepko C. L., Sharp P. A., Roberts B. E. (1981). Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6121—6125.
250. Robinson A. J., Younghusband H. B., Bellett A. J. D. (1973). A circular DNA-protein complex from adenoviruses, *Virology*, **56**, 54—69.
251. Rogers J., Wall R. (1980). A mechanism for RNA splicing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1877—1879.
252. Rose J. A. (1974). Parvovirus reproduction. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 3, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 1—61, Plenum Press, New York.
253. Rosen I. (1960). A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses, *Am. J. Hygiene*, **71**, 120—128.
254. Rosenwirth B., Shiroki K., Levine A. J., Shimojo H. (1975). Isolation and characterization of adenovirus type 12 DNA-binding proteins, *Virology*, **67**, 14—23.

255. Ross S. R., Flint S. J., Levine A. J. (1980). Identification of the adenovirus early proteins and their genomic map positions, *Virology*, **100**, 419—432.
256. Rouse H. C., Schlesinger R. W. (1967). An arginine-dependent step in the maturation of type 1 adenovirus, *Virology*, **33**, 513—522.
257. Rowe W. P., Baum S. G. (1965). Studies of adenovirus SV40 hybrid viruses. II. Defectiveness of the hybrid particles, *J. Exp. Med.*, **122**, 955—966.
258. Rowe W. P., Huebner R. J., Gilmore L. K., Parrott R. H., Ward T. G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**, 570—573.
- 258a. Russell W. C., Laver W. G., Sanderson P. J. (1968). Internal components of adenovirus, *Nature (Lond.)*, **219**, 1127—1130.
259. Sambrook J., Williams J. F., Sharp P. A., Grodzicker T. (1975). Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses, *J. Mol. Biol.*, **97**, 369—390.
260. Sambrook J., Botchan M., Gallimore P., Ozanne B., Petterson U., Williams J. F., Sharp P. A. (1974). Viral DNA sequences in cells transformed by simian virus 40, adenovirus type 2 and adenovirus type 5, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 615—632.
261. Sarnow P., Ho Y. S., Williams J., Levine A. J. (1982). Adenovirus E1B-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells, *Cell*, **28**, 387—394.
262. Sarnow P., Hearing P., Anderson C. W., Reich N., Levine A. J. (1982). Identification and characterization of an immunologically conserved adenovirus early region 11,000 M<sub>r</sub> protein and its association with the nuclear matrix, *J. Mol. Biol.*, **162**, 565—583.
263. Schrier P. I., Bernards R., Vaessen R. T. M. J., Houweling A., van der Eb (1983). Expression of class I major histocompatibility antigen switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells, *Nature (Lond.)*, **305**, 771—775.
264. Sharp P. A., Gallimore P. H., Flint S. J. (1975). Mapping of adenovirus 2 RNA sequences in lytically infected cells and transformed cell lines, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 457—474.
265. Sharp P. A., Moore C., Haverty J. (1976). The infectivity of adenovirus 5 DNA-protein complex, *Virology*, **75**, 442—456.
266. Shaw A. R., Ziff E. B. (1980). Transcripts from the adenovirus-2 major late promoter yield a single early family of 3' coterminal mRNAs and five late families, *Cell*, **22**, 905—916.
267. Shaw A. R., Ziff E. B. (1982). Selective inhibition of adenovirus type 2 early region II and III transcription by an anisomycin block of protein synthesis, *Mol. Cell. Biochem.*, **2**, 789—799.
268. Shenk T., Jones N., Colby W., Fowlkes D. (1979). Functional analysis of adenovirus type 5 host-range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 367—375.
- 268a. Shenk T., Williams J. (1984). Genetic analysis of adenoviruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **111** (No. 3), 1—39.
269. Shimojo H., Yamashita T. (1968). Induction of DNA synthesis by adenoviruses in contact-inhibited cells, *Virology*, **36**, 422—433.
270. Shinagawa M., Padmanabhan R. (1980). Comparative sequence analysis of the inverted terminal repetitions from different adenoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3831—3835.
271. Shiroki K., Irisawa J., Shimojo H. (1972). Isolation and a preliminary characterization of temperature sensitive mutants of adenovirus 12, *Virology*, **49**, 1—11.
272. Shiroki K., Shimojo H., Yamaguchi K. (1974). The viral DNA replication complex of adenovirus 12, *Virology*, **60**, 192—199.

273. Simmons T., Heywood P., Hodge L. D. (1974). Intracellular site of replication of adenovirus DNA, *J. Mol. Biol.*, **89**, 423—433.
274. Smart J., Stillman B. W. (1982). Adenovirus terminal protein precursor. Partial amino acid sequence and the site of covalent linkage to virus DNA, *J. Biol. Chem.*, **257**, 13499—13506.
275. Spindler K. R., Rosser D. S. E., Berk A. J. (1984). Analysis of adenovirus transforming proteins from early regions 1A and 1B with antisera to inducible fusion antigens produced in *Escherichia coli*, *J. Virol.*, **49**, 132—141.
276. Steenberg P. H., Maat J., van Ormondt H., Sussenbach J. S. (1977). The sequence at the termini of adenovirus type 5 DNA, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 4371—4389.
277. Stillman B. W. (1981). Adenovirus DNA replication in vitro: A protein linked to the 5' end of nascent DNA strands, *J. Virol.*, **37**, 139—147.
278. Stillman B. W., Bellett A. J. D., Robinson J. (1977). Replication of linear adenovirus DNA is not hairpin-primed, *Nature (Lond.)*, **269**, 723—725.
279. Stillman B. W., Bellett B. J. D. (1978). Replication of DNA in adenovirus infected cells, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 729—739.
280. Stillman B. W., Bellett A. J. D. (1979). An adenovirus protein associated with the ends of replication DNA molecules, *Virology*, **93**, 69—79.
281. Stillman B. W., Tamanoi F. (1982). Adenovirus DNA replication: DNA sequences and enzymes required for initiation in vitro, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 741—750.
282. Stillman B. W., Topp W. C., Engler J. A. (1982). Conserved sequences at the origin of adenovirus DNA replication, *J. Virol.*, **44**, 530—537.
283. Stillman B. W., Lewis J. B., Chow L. T., Mathews M. B., Smart E. (1981). Identification of the gene and mRNA for the adenovirus terminal protein precursor, *Cell*, **23**, 497—508.
284. Stow N. D. (1981). Cloning of a DNA fragment from the left hand terminus of the adenovirus type 2 genome and its use in site directed mutagenesis, *J. Virol.*, **37**, 171—180.
285. Sussenbach J. S. (1967). Early events in the infection process of adenovirus type 5 in HeLa cells, *Virology*, **33**, 567—574.
286. Sussenbach J. S., Kuijk M. G. (1977). Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. V. The location of termini of replication, *Virology*, **77**, 149—157.
287. Sussenbach J. S., van der Vliet P. C. (1972). Viral DNA synthesis in isolated nuclei from adenovirus-infected KB cells, *FEBS Lett.*, **21**, 7—10.
288. Sussenbach J. S., Ellens D. J., Jansz H. S. (1973). Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. I. The nature of single-stranded DNA in replicative intermediates, *J. Virol.*, **12**, 1131—1138.
289. Sussenbach J. S., van der Vliet P. C., Ellens D. J., Jansz H. S. (1972). Linear intermediates in the replication of adenovirus DNA, *Nature (Lond.)*, **239**, 47—49.
290. Suzuki E., Shimojo H. (1971). A temperature-sensitive mutant of adenovirus 31 is defective in viral DNA replication, *Virology*, **43**, 488—494.
291. Takemori N. (1972). Genetic studies with tumorigenic adenoviruses. III. Recombination of adenovirus type 12, *Virology*, **47**, 157—167.
292. Takemori N., Riggs J. L., Aldrich C. (1968). Genetic studies with tumorigenic adenoviruses. I. Isolation of cytotoxic (*cyt*) mutants of adenovirus type 12, *Virology*, **36**, 575—586.
293. Tamanoi F., Stillman B. W. (1982). Function of adenovirus terminal protein in the initiation of DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2221—2225.
294. Tamanoi F., Stillman B. W. (1983). Initiation of adenovirus DNA replication of in vitro requires a specific DNA sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6446—6450.



295. Tate V., Philipson J. (1979). Parental adenovirus DNA accumulates in nucleosome-like structures in infected cells, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 2769—2785.
296. Thimmappaya B., Weinberger C., Schneider R. J., Shenk T. (1984). Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNA at late times after infection, *Cell* (in press).
297. Thomas D. C., Green M. (1969). Biochemical studies on adenovirus multiplication. XV. Transcription of the adenovirus type 2 genome during productive infection, *Virology*, **39**, 205—210.
298. Thomas G. P., Mathews M. B. (1980). DNA replication and the early to late transition in adenovirus infection, *Cell*, **22**, 523—533.
299. Tibbetts C. (1977). Viral DNA sequences from incomplete particles of human adenovirus type 7, *Cell*, **12**, 243—249.
300. Tibbetts C., Pettersson U., Johansson K., Philipson L. (1974). Transcription of adenovirus type 2 genome. I. Relationship of cytoplasmic RNA to the complementation strands of viral DNA, *J. Virol.*, **13**, 370—377.
301. Tjian R. (1978). The binding site on SV40 for a T antigen-related protein, *Cell*, **13**, 165—179.
302. Tooze J. (1981). *DNA Tumor Viruses: Molecular Biology of Tumor Viruses*. 2d Ed., pp. 937—1036, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 302a. Tooze J. (1981). *DNA Tumor Viruses: Molecular Biology of Tumor Viruses*, 2d Ed., p. 459, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 302b. Ibid., pp. 943—1054.
- 302c. Ibid., pp. 1059—1060.
303. Trentin J. J., Yabe Y., Taylor G. (1962). The quest for human cancer viruses, *Science*, **137**, 835—849.
304. Valentine R. C., Pereira H. G. (1965). Antigens and structure of the adenovirus, *J. Mol. Biol.*, **13**, 13—20.
305. van Bergen B. G. M., van der Vliet P. C. (1983). Temperature-sensitive initiation and elongation of adenovirus DNA replication in vitro with nuclear extracts from H5ts36, H5ts149 and H5ts125 infected HeLa cells, *J. Virol.*, **46**, 642—648.
306. van Bergen B. G. M., van der Ley P. A., van Driel W., van Mansfield A. D. M., van der Vliet P. C. (1983). Replication of origin containing adenovirus DNA fragments that do not carry the terminal protein, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1975—1989.
307. Van der Eb A. J. (1973). Intermediates in type 5 adenovirus DNA replication, *Virology*, **51**, 11—23.
308. van der Eb A. J., van der Elsen P., Jochemsen H., Lupker J. H., Maat J., van Ormondt H., Schrier P. I. (1979). Structure and function of adenovirus 5 transformation genes, *J. Supramol. Struct. (Suppl. 3)*, 128.
309. van der Eb A. J., van Ormondt H., Schrier P. I., Lupker J. H., Jochemsen H., van der Elsen P. J., DeLeys R. J., Maat J., van Beveren C. P., Dijkema R., deWaard A. (1980). Structure and function of the transforming genes of human adenoviruses and SV40, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 383—399.
310. van der Vliet P. C., Levine A. J. (1973). DNA-binding proteins specific for cells infected by adenovirus, *Nature (Lond.)*, **246**, 170—174.
311. van der Vliet P. C., Sussenbach J. S. (1972). The mechanism of adenovirus DNA synthesis in isolated nuclei, *Eur. J. Biochem.*, **30**, 584.
312. van der Vliet P. C., Sussenbach J. S. (1975). An adenovirus type 5 gene required for initiation of viral DNA replication, *Virology*, **67**, 415—426.
313. van der Vliet P. C., Levine A. J., Ensinger M. J., Ginsberg H. S. (1975). Thermolabile DNA-binding protein from cells infected with a temperature-sensitive mutant of adenovirus defective in viral DNA synthesis, *J. Virol.*, **15**, 348—354.

314. *van Oortmersson E. A. C., Regensburg B. A., Tassenron-de Jong J. G., Bosch L.* (1975). Differential inhibition of the in vivo synthesis of adenovirus type 5 specific RNAs by cordycepin, *Virology*, **65**, 238—247.
- 314a. *van Ormondt H., Galibert F.* (1984). Nucleotide sequences of adenovirus DNAs, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **110** (No. 2), 73—142.
315. *Vardimon L., Neumann R., Kuhlmann I., Sutter D., Doerfler W.* (1980). DNA methylation and viral gene expression in adenovirus-transformed and-infected cells, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2461—2473.
316. *Vayda M. E., Rogers A. E., Flint S. J.* (1983). The structure of nucleoprotein cores released from adenoviruses, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 441—460.
317. *Vlak J.-M., Rozijn T. H., Spies F.* (1975). Licalization of adenovirus DNA replication in KB cells, *Virology*, **65**, 535—545.
318. *Vlak J. M., Rozijn T. H., Sussenbach J. S.* (1975). Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. IV. Discontinuous DNA chain propagation, *Virology*, **63**, 168—175.
319. *Wadell G., Hammarshjold M. L., Winberg G., Varsanyi T. M., Sundell G.* (1980). Genetic variability of adenoviruses, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **354**, 16—42.
320. *Wallace R. D., Kates J.* (1977). State of adenovirus 2 DNA in the nucleus and its mode of transcription: Studies with isolated viral DNA protein complexes and isolated nuclei, *J. Virol.*, **9**, 627—635.
321. *Walter G., Maizel Jr., J. V.* (1974). The polypeptides of adenovirus. IV. Detection of early and late virus-induced polypeptides and their distribution in subcellular fractions, *Virology*, **57**, 402—408.
322. *Weber J.* (1976). Genetic analysis of adenovirus type 2. III. Temperature sensitivity of processing of viral proteins, *J. Virol.*, **17**, 462—471.
323. *Weber J., Begin M., Carstens E. B.* (1977). Genetic analysis of adenovirus type 2. IV. Coordinate regulation of polypeptides 80K, IIIa and V, *Virology*, **76**, 709—724.
324. *Weber J., Jelinek W., Darnell J. E., Jr.* (1977). The definition of a large viral transcription unit late in Ad2 infection of HeLa cells: Mapping of nascent RNA molecules labeled in isolated nuclei, *Cell*, **10**, 611—616.
325. Reference deleted in proof.
326. *Weil A., Luse D. L., Segall J., Roeder R. G.* (1979). Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II, *Cell*, **18**, 469—484.
327. *Weingarten B., Keller W.* (1981). Transcription and processing of adenoviral RNA by extracts from HeLa cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4092—4096.
328. *Weingarten B., Winnacker F. L., Tolun A., Pettersson U.* (1976). Two complementary strand-specific termination sites for adenovirus DNA replication, *Cell*, **9**, 259—268.
329. *Weinmann R., Brendler T. G., Raskas H. J., Roeder R. G.* (1976). Low molecular weight viral RNAs transcribed by RNA polymerase III during adenovirus 2 infection, *Cell*, **7**, 557—566.
330. *Wigand R., Baumeister H. G., Maass G., Kuhn J., Hammer H. J.* (1983). Isolation and identification of enteric adenoviruses, *J. Med. Virol.*, **11**, 233—240.
331. *Wilhelm J., Ginsberg H. S.* (1972). Synthesis in vitro of type 5 adenovirus capsid proteins, *J. Virol.*, **9**, 973—980.
332. *Williams J. F., Ustacelebi S.* (1971). Complementation and recombination with temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5, *J. Gen. Virol.*, **13**, 345—348.
333. *Williams J. F., Young H., Austin P.* (1975). Genetic analysis of human adenovirus type 5 in permissive and nonpermissive cells, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 427—437.

334. Wilson M. C., Fraser N. W., Darnell J. E., Jr. (1979). Mapping of RNA initiation sites by high doses of UV-irradiation: Evidence for three independent promoters within the left-hand 11% of the Ad2 genome, *Virology*, **94**, 175—184.
335. Winnacker E. L. (1975). Adenovirus type 2 DNA replication. I. Evidence for discontinuous replication, *J. Virol.*, **15**, 744—758.
336. Winters W. D., Russell W. C. (1971). Studies on the assembly of adenovirus in vitro, *J. Gen. Virol.*, **10**, 181—194.
- 336a. Wold S. M., Green M., Buttner W. (1978). Adenoviruses. In: *The Molecular Biology of Animal Viruses*, ed. by D. P. Nyack, pp. 673—768, New York, Marcel Dekker.
337. Wolfson J., Dressler D. (1972). Adenovirus DNA contains an inverted terminal repetition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3054—3057.
338. Wu G. J. (1978). Adenovirus DNA-directed transcription of 5.5S RNA in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2175—2179.
339. Yamashita T., Green M. (1974). Adenovirus DNA replication. I. Requirement for protein synthesis and isolation of nuclear membrane fractions containing newly synthesized viral DNA and proteins, *J. Virol.*, **14**, 412—420.
340. Yamashita T., Arens M., Green M. J. (1977). Adenovirus deoxyribonucleic acid replication. Isolation of a soluble replication system and analysis of the in vitro DNA product, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7940—7946.
341. Yang V. W., Lerner M., Steitz J. A., Flint S. J. (1981). A small, nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1371—1375.
- 341a. Young C. S. H., Shenk T., Ginsberg H. S. (1984). The genetic system. In: *The Adenoviruses Comprehensive Virology*, Vol. 4, ed. by H. S. Ginsberg, pp. 125—172, Plenum Press, New York.
- 341b. Zeevi M., Nevins J. R., Darnell J. E., Jr. (1982). Newly formed mRNA lacking polyadenylic acid enters the cytoplasm and the polyribosomes but has a shorter half-life in the absence of polyadenylic acid, *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 517—525.
342. Ziff E. B., Evans R. M. (1978). Coincidence of the promoter and capped 5' terminus of RNA from the adenovirus 2 major late transcription unit, *Cell*, **15**, 1463—1476.
343. Zorin G. A., Anderson C. W. (1981). Adenovirus type 2 express fiber in monkey-human hybrids and reconstructed cells, *J. Virol.*, **37**, 759—769.



## Герпесвирусы и их репликация

*Бернард Ройзман, Уильям Баттерсон<sup>1</sup>*

### Общее определение и свойства

Принадлежность к сем. *Herpesviridae* определяется присутствием в составе вириона двухцепочечной линейной ДНК, икосаэдрического капсида из 162 капсомеров, сборка которого происходит в ядре, и оболочки, образующейся из ядерной мембраны.

Герпесвирусы очень широко распространены в природе. Среди высших эукариот редко встречаются такие, которые не подвергались бы заражению хотя бы одним из представителей этого семейства вирусов. Известно около 80 в той или иной степени охарактеризованных герпесвирусов: пять из них выделены от человека [вирус простого герпеса 1 (HSV-1), вирус простого герпеса 2 (HSV-2), цитомегаловирус (CMV), вирус ветряной оспы/опоясывающего лишая (VZV) и вирус Эпштейна — Барр (EBV)], четыре — от лошади, по меньшей мере три — от коров, два — от свиней [вирус псевдобешенства (PSV) и цитомегаловирус свиней], два — от кур [герпесвирус болезни Марека (MDV) и вирус инфекционного ларинготрахеита]. Наиболее изученные вирусы и их свойства перечислены в табл. 29.1.

Герпесвирусы крайне разнообразны по биологическим свойствам. Некоторые из них имеют довольно широкий спектр хозяев, они очень эффективно размножаются, быстро разрушая заражаемые ими клетки (HSV-1, HSV-2, PSV). Другие, в частности EBV, имеют более узкий спектр хозяев. Некоторые герпесвирусы размножаются довольно медленно, и в этом случае они обладают менее выраженным цитопатическим действием (CMV). Имеются герпесвирусы (MDV, герпесвирус Люкке лягушек [95]), способные вызывать злокачественные опухоли. Одним из наиболее характерных свойств герпесвирусов является их способность оставаться в латентном состоянии в хозяине, в котором они размножаются. Механизм, обеспечивающий латентность, определяется действием специальных вирусных генов, а также ассоциацией вирусов с клетками подходящего типа [257].

---

<sup>1</sup> *Bernard Roizman, William Batterson, Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago, Chicago, Illinois 60637.*

Таблица 29.1. Некоторые вирусы сем. *Herpesviridae*

Вирус	Общепринятое название (синонимы)	Под- семей- ство	G + C, мол. %	Свойства ге- нома, груп- па, мол. масса · 10 <sup>6</sup>	Источник данных
<b>Вирусы человека</b>					
Герпесвирус человека 1	Вирус простого герпеса 1	α	67	E (96)	[97, 258, 259]
Герпесвирус человека 2	Вирус простого герпеса 2	α	69	E (96)	[258, 259, 274, 334]
Герпесвирус человека 3	Вирус ветряной оспы/опоясываю- щего лишая	α	46	D (100)	[59, 128, 178, 325]
Герпесвирус человека 4	Вирус Эпштейна—Барр	γ	59	C (114)	[64, 276]
Герпесвирус человека 5	Цитомегаловирус	β	57	E (145)	[234, 288, 300]
<b>Вирусы приматов (кроме человека)</b>					
Герпесвирус аотус 1	Герпесвирус аотус типа 1	β	56	E (145)	[49]
Герпесвирус аотус 2	Герпесвирус аотус типа 2	γ	—	B (100)	[71]
Герпесвирус аотус 3	Герпесвирус аотус типа 3	β	56	E (145)	[48, 60]
Герпесвирус ателес 2	Герпесвирус ателес штамм 810	γ	48	B (90)	[73]
Герпесвирус церкопитекус 2	SA8	α	67	E (100)	[92]
Герпесвирус церкопитекус 12	Герпесвирус павиана	γ	—	C (114)	[66, 109]
Герпесвирус понгид 1a	Герпесвирус шимпанзе	γ	—	C (114)	[110, 165]
Герпесвирус саймири 2	Герпесвирус беличьих обезьян саймири	γ	46	B (103)	[199]
<b>Вирусы других млекопитающих</b>					
Герпесвирус крупного рогатого скота 1	Вирус инфекционного ринотрахеи- та крупного рогатого скота Вирус инфекционного пустулезно- го вульвовагинита	α	72	D	[87, 184, 234]

Вирус	Общепринятое название (синонимы)	Под- семей- ство	G+C, мол. %	Свойства ге- нома, груп- па, мол. масса · 10 <sup>6</sup>	Источник данных
Герпесвирус крупного рогатого скота 2	Вирус мамилита крупного рогатого скота, вирус Аллертона, вирус псевдоморщинистости кожи	α	64	E (88)	[29, 30, 87, 189]
Герпесвирус лошадей 1	Вирус ринопневмонита лошадей, вирус аборта лошадей	α	57	D (94)	[233, 252]
Герпесвирус свиней 1	Вирус псевдобешенства, вирус болезни Ауески	α	74	D (91)	[98]
<b>Вирусы птиц</b>					
Герпесвирус кур 2	Герпесвирус болезни Марека	γ	46	E (110)	[38, 169]
Герпесвирус индеек 1	Герпесвирус индейки	γ	48	E (104)	[38, 145, 169]
<b>Вирусы рыб</b>					
Вирус кошачьего сомика 1	Вирус кошачьего сомика (CCV)	α	56	A (86)	[37, 332]



## Классификация

Представители сем. *Herpesviridae* разбиты на основе их биологических свойств на три подсемейства— $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae*) [190]. Начата работа по группировке вирусов по родам на основе нуклеотидных последовательностей вирусных геномов и серологической специфичности генных продуктов [260, 267].

### *Alphaherpesvirinae*

Члены этого подсемейства характеризуются широким спектром хозяев, относительно коротким репродуктивным циклом, быстрым распространением по клеточной культуре, эффективным разрушением зараженных клеток и способностью существовать в латентной форме, преимущественно, хотя и не исключительно, в ганглиях. В это подсемейство входит род *Simplexvirus* (HSV-1, HSV-2, вирус мамиллита крупного рогатого скота) и род *Poikilovirus* [PSV, VZV и вирус герпеса лошадей типа 1 (EHV-1)].

### *Betaherpesvirinae*

Для вирусов этого подсемейства характерен ограниченный спектр хозяев, хотя это и не абсолютный признак. Репродуктивный цикл идет долго, и заражение распространяется по культуре клеток медленно. Зараженные клетки часто увеличиваются в размере (цитомегалия), легко возникает и поддерживается персистентная инфекция в культуре. Вирус может поддерживаться в латентной форме в секреторных железах, лимфорецикулярных клетках, почках и других тканях. В состав этого подсемейства входит род *Cytomegalovirus* (CMV) и род *Muromegalovirus* (цитомегаловирус мышей).

### *Gammaherpesvirinae*

Спектр хозяев, экспериментально устанавливаемый для вирусов этого подсемейства, ограничивается животными тех же семейств или отрядов, из которых выделен природный вирус. *In vitro* все вирусы этого подсемейства способны реплицироваться в лимфобластоидных клетках, некоторые из них могут вызывать литическую инфекцию в эпителиоидных клетках и фибробластах. Вирусы этой группы специфичны либо к Т-, либо к В-лимфоцитам. В лимфоцитах инфекционный процесс иногда останавливается на прелитической или литической стадии, т. е. продуктивное потомство отсутствует. Латентный вирус часто об-

наруживается в лимфоидной ткани. В это подсемейство входят три рода: *Lymphocryptovirus* (например, EBV), *Thetalymphocryptovirus* (например, MDV) и *Rhadinovirus* (например, герпесвирусы обезьян *Ateles* и *Saimiri*).

### План изложения

Герпесвирусы не удается группировать ни по морфологии вириона, ни по общим признакам, характерным для их репродуктивного цикла. Существенные различия между ними обнаруживаются при анализе структуры их генома, специфических особенностей репродуктивного цикла и действия вирусов на клетки. Интерес к герпесвирусам связан с их способностью вызывать очень опасные инфекции, рекуррентные заболевания (Alphaherpesvirinae и особенно HSV), трансплацентарные инфекции с возникновением врожденных уродств (некоторые Betaherpesvirinae и особенно CMV), потенциально летальные лимфопролиферативные заболевания (Gammaherpesvirinae и особенно EBV). Хотя объектами интенсивного изучения служат многие герпесвирусы человека и животных, больше всего работ сделано на Alphaherpesvirinae (HSV-1, HSV-2, PSV, EHV-1 и т. д.). По этой причине основное внимание в данной главе будет сосредоточено на Alphaherpesvirinae; иногда будут упоминаться и другие вирусы, если по ним имеется соответствующая информация.

## Вирион

### Архитектура

#### Морфологические субъединицы

Вирион вируса герпеса состоит из четырех структурных элементов: из непрозрачной для электронов *сердцевины*; окружающего сердцевину икосаэдрического *капсида*; асимметрично распределенного вокруг капсида электроноплотного материала, обозначаемого как *тегумент*; и наружной мембраны, или *оболочки*, окружающей капсид и тегумент (рис. 29.1).

Сердцевина зрелого вириона имеет тороидальную форму и содержит вирусную ДНК [84, 107, 211]. У некоторых герпесвирусов этот тороид как бы подвешен на белковом веретене из волокон, закрепленных на внутренней стороне капсида и проходящих через отверстие тороида. Точное расположение ДНК вдоль тороида неизвестно.

У всех герпесвирусов капсид обладает рядом общих структурных признаков: он имеет 100 нм в диаметре и состоит из 162 капсомеров. Пентамерные капсомеры в вершинах икосаэдель-

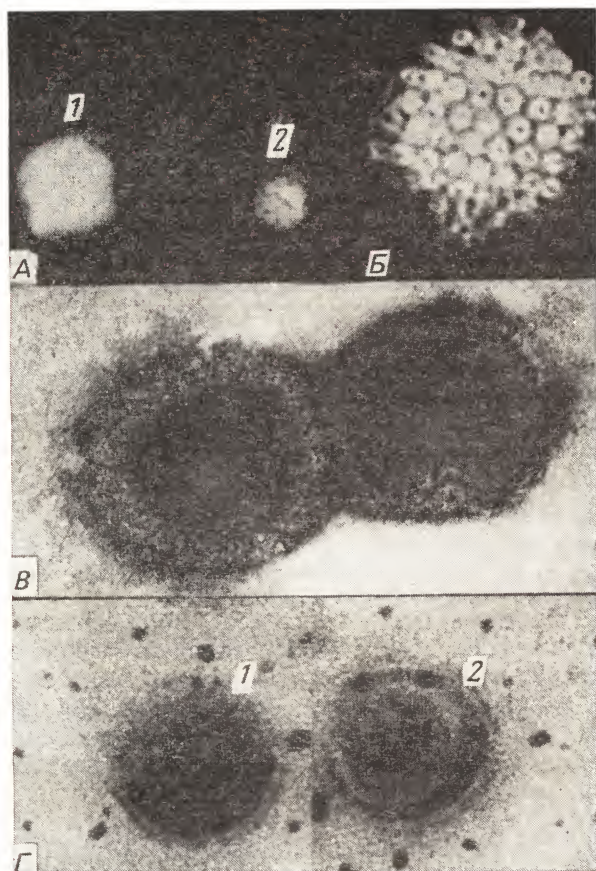


Рис. 29.1. Электронные микрофотографии нуклеокапсидов и вирионов HSV. А, Б. Негативно окрашенные препараты. В, Г. Тонкие срезы зараженных клеток. А. 1 — интактный вирион, непроницаемый для негативной краски, 2 — капсид. Б. Нуклеокапсид: видна характерная для герпесвирусов капсомерная структура. В. Вирионы с поврежденными оболочками, позволяющие видеть электроплотный тегумент, расположенный между поверхностью капсида и внутренней стороной оболочки. Г. Две частицы с разной ориентацией торондальной сердцевины. В случае вириона 1 срез сделан через торонд перпендикулярно оси симметрии; в случае вириона 2 срез сделан параллельно этой оси.

таэдра детально не охарактеризованы. Размеры гексамерных капсомеров составляют  $9,5 \times 12,5$  нм в продольном разрезе; от поверхности капсомера вдоль длинной оси проходит канал диаметром 4 нм [329].

Тегумент, который предложили так назвать Ройzman и Ферлонг [262], находится между капсидом и оболочкой, практически



не виден на тонких срезах, но при негативном окрашивании выглядит как волокнистый материал [204, 205, 277, 329]. Толщина тегумента варьирует в зависимости от местонахождения вириона внутри зараженной клетки; она больше в вирионах, скапливающихся в цитоплазматических вакуолях, и меньше в вирионах, сосредоточенных в перинуклеарном пространстве [74]. Имеющиеся данные указывают, что количество материала тегумента определяется вирусом, а не клеткой-хозяином [194], а его распределение чаще всего носит асимметричный характер.

Электронно-микроскопическое изучение тонких срезов показало, что наружная оболочка вируса имеет типично трехслойный вид [62]; по-видимому, она формируется из участков модифицированных клеточных мембран [4, 67, 205]. Присутствие липидов установлено путем прямого химического анализа вирионов [4, 16], а также следует из чувствительности вирионов к липидным растворителям и детергентам [100, 293, 297]. Оболочка вируса герпеса содержит многочисленные выступы — «шипы» (пепломеры); по сравнению с другими вирусами, имеющими липидную оболочку, у герпесвирусов этих «шипов» больше, но они короче по длине. Уилди и Уотсон [329] измерили длину «шипов» вирионов HSV, которая оказалась равной 8 нм.

Для HSV сборка пустых капсидов, не содержащих ДНК, — явление редкое [262, 314]. Размер вириона у герпесвирусов колеблется от 120 до ~300 нм. Эти вариации частично обусловлены разной толщиной тегумента. Другой причиной вариаций размеров является состояние оболочки. Неповрежденная оболочка непроницаема и обеспечивает поддержание квазисферической формы вириона. Если оболочка повреждена, то она пропускает внутрь негативный краситель, и вирион выглядит как яичница-глазунья, причем его диаметр больше, чем диаметр интактного вириона.

## ДНК

### Размер, конформация, состав оснований

ДНК, выделенная из вирионов вируса герпеса, представляет собой линейную двухцепочечную молекулу. Выделенная ДНК во множестве мест имеет одноцепочечные разрывы и пробелы.

Если такую ДНК денатурировать щелочью [77, 150, 331] или формамидом (S. Wadsworth, B. Roizman, неопубликованные данные), образуются ее фрагменты. Согласно ряду сообщений, упакованная ДНК содержит в своем составе рибонуклеотиды [24, 112], но их присутствием нельзя полностью объяснить степень фрагментации ДНК.

ДНК разных герпесвирусов различаются по молекулярной массе и составу оснований. Молекулярные массы варьируют примерно от  $80 \cdot 10^6$  до  $150 \cdot 10^6$  (табл. 29.1). Вариации молекулярной массы ДНК для каждого конкретного вида вирусов минимальны, но все же заметны. Так, многие вирусные ДНК содержат на концах и в середине цепи повторяющиеся последовательности. В связи с разным числом этих повторов различия в молекулярной массе ДНК могут в некоторых случаях достигать 20 kb. У ДНК HSV после нескольких пассажей вне организма человека обнаружались вариации в молекулярной массе, достигающие  $2 \cdot 10^6$ . У штамма HSV-1 (HFEM) после многочисленных пассажей вне организма человека наблюдали делецию в 4 kb. Приходится признать, что вариации в размерах ДНК не являются отражением различий между индивидуальными герпесвирусами.

Состав оснований ДНК герпесвирусов в моль-процентах (G+C)-пар колеблется от 32 до 74 (табл. 29.1). Кроме того, наблюдаются вариации в степени гомогенности нуклеотидной последовательности. Неоднородность популяции молекул ДНК по составу оснований может быть весьма незначительной (например, у HSV), но может быть и очень высокой (например, в ДНК герпесвирусов обезьян *Saimiri* и *Ateles*).

#### Организация нуклеотидной последовательности

Вероятно, одним из наиболее интересных свойств ДНК герпесвирусов можно считать организацию нуклеотидной последовательности. По этому признаку все изученные к настоящему времени ДНК герпесвирусов распадаются в основном на пять типов. Они схематически показаны на рис. 29.2, в подписи к которому приведены подробные пояснения. Хотя первым герпесвирусом, для ДНК которого стала известна полная нуклеотидная последовательность, был EBV, функциональное значение организации последовательности ДНК лучше выяснено на примере вируса HSV, поэтому на последовательности ДНК именно этого вируса мы остановимся более подробно. На рис. 29.2 представлена последовательность ДНК HSV-1 (F). Основные особенности структуры этой ДНК состоят в следующем.

а) ДНК HSV удобно рассматривать как молекулу, состоящую из двух ковалентно связанных компонентов, длинного L-компонента и короткого S-компонента, на долю которых приходится 82 и 18% вирусной ДНК соответственно. Каждый компонент состоит в основном из уникальных последовательностей ( $U_L$  и  $U_S$ ), фланкированных инвертированными повторами. Это заключение основано на том, что при отжиге каждой из интактных одиночных цепей образуются две одноцепочечные петли неодинаковой длины, соединенные отрезком двухцепочечной ДНК [282].

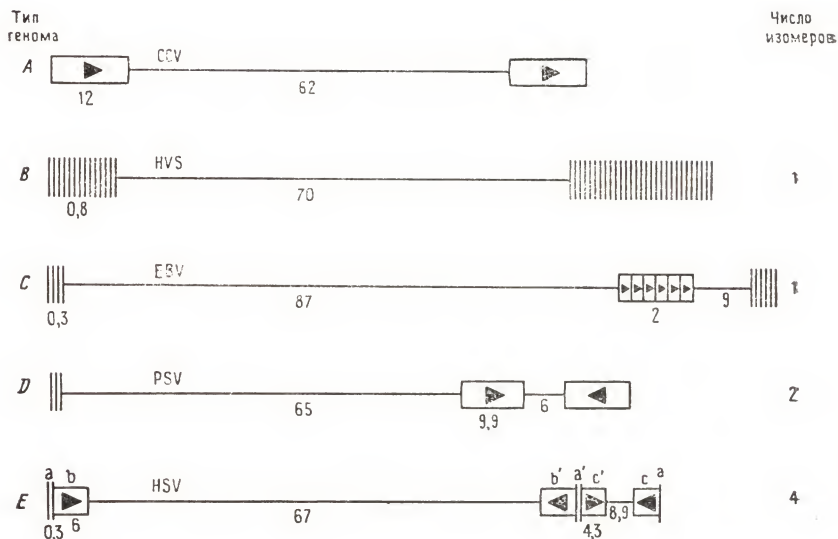


Рис. 29.2. Схема организации генома у пяти типов вирусов *Herpesviridae*. Геномы типа *A*, *B*, *C*, *D* и *E* представлены соответственно герпесвирусом кошачьего сомика (CCV), герпесвирусом саймири (HVS), вирусом Эпштейна — Барр (EBV), вирусом псевдобешенства (PSV) и вирусом простого герпеса (HSV). Горизонтальными линиями обозначены уникальные или квазиуникальные последовательности. Повторы длиннее 1000 бп, если они не являются концевыми, показаны в виде прямоугольников. Стрелки внутри прямоугольника позволяют различать прямые и инвертированные повторы. Если подряд следует несколько серий крупных повторов, они обозначаются буквами (например, повторы *b* и *c* в ДНК HSV). Длинными вертикальными черточками обозначены концевые последовательности, известные для геномов типа *B*, *C*, *D* и *E*. Все они относятся к группе прямых повторов. Для геномов типа *E* концевые повторы обозначены как *a*-последовательности; они представлены в виде инвертированных повторов во внутренней части генома. Цифры указывают значения молекулярной массы (в миллионах дальтон). Цифры под вертикальными черточками указывают молекулярную массу, приходящуюся на один концевой повтор. Размеры полной последовательности могут варьировать от одного штамма к другому. Геномы типа *A*, *B* и *C* существуют только в одной ориентации (в виде одного изомера). В *D*- и *E*-геномах последовательности, заключенные между инвертированными повторами, могут быть инвертированы, что дает два изомера для *D*-геномов и четыре изомера для *E*-геномов. Другие представители геномов типа *B*, *C*, *D* и *E* приведены в табл. 29.1.

б) Инвертированные последовательности, находящиеся по обе стороны фрагмента  $U_L$ , обозначают  $ab$  и  $b'a'$ ; каждая из них содержит по 6% всей ДНК. Инвертированные последовательности по обе стороны  $U_S$  обозначают  $a'c'$  и  $ca$ : на долю каждой из них приходится 4,3% всей ДНК. На основании измерений длины двухцепочечных участков, образующихся при самоотжиге интактных цепей, и результатов изучения процесса частичной денатура-





Рис. 29.3. Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента ДНК на участке, соединяющем L- и S-компоненты HSV-1. Верхняя горизонтальная линия схематически отражает организацию последовательности ДНК HSV-1. Далее приведены нуклеотидные последовательности части участка  $b'$ , всего участка  $a'$  и части участка  $c'$ . Цифры 1, 2 и 3 соответствуют штаммам HSV-1 (F) [201], 17 [52] и US [52]. Пробелами выделены позиции, в которых наблюдается дивергенция последовательностей.

ции был сделан вывод о том, что они отличаются по составу оснований от участков  $ab$  и  $b'a'$  [315].

в) После отщепления одноцепочечных участков на двух концах под действием экзонуклеазы ДНК HSV можно перевести путем самоотжига в кольцевую форму [93, 281]. Концевые участки, ставшие одноцепочечными и поэтому способные замкнуть ДНК в кольцо при отжиге, обозначают как  $\alpha$ -последовательности [315]. Для получения кольцевой ДНК оптимально отщепление экзонуклеазой 400—800 нуклеотидов [315]; эта оценка, полученная для HSV1 (F), находится в хорошем согласии с цифрой 500 bp, полученной в ходе прямого определения последовательности ДНК [202]. Впрочем, длина последовательности  $\alpha$  варьирует от одного штамма к другому [52, 176, 311, 319]. Эти вариации частично обусловлены числом tandemных повторов, формирующих последовательность  $\alpha$  (рис. 29.3). Так, например, последовательность  $\alpha$  вируса HSV-1 (F) состоит из прямого повтора 20 bp (DR1); уникальной последовательности из 65 bp ( $U_b$ ); отрезка из 12 bp (DR2), повторенного от 19 до 23 раз; отрезка из 37 bp (DR4), повторенного от 2 до 3 раз; уникальной последовательности из 58 bp ( $U_c$ ) и второй копии DR1 (рис. 29.2).

г) Большинство штаммов HSV-1 содержат на конце S-компонента одну  $\alpha$ -последовательность, тогда как на отрезке, соединяющем L- и S-компоненты, и на конце L-компонента их число может варьировать [176, 319]. Следующие друг за другом  $\alpha$ -последовательности имеют общий DR1-участок [202]. Участок DR1 на L-конце содержит  $18\frac{1}{2}$  bp, т. е. имеет выступающий из цепи неспаренный 3'-нуклеотид, за которым следует участок из 18 bp. Концевой DR1 в составе уникальной  $\alpha$ -последовательности на S-конце также содержит подобный неспаренный 3'-нуклеотид, за которым следует только 1 bp, так что в этом случае DR1 содержит  $1\frac{1}{2}$  bp.  $18\frac{1}{2}$  bp оснований на L-конце и  $1\frac{1}{2}$  bp на S-конце вместе составляют полный DR1 [202]. Наиболее простое объяснение таких нуклеотидных последовательностей состоит в том, что ДНК зрелого вируса HSV-1 образуется путем разрыва конкатемерной или кольцевой ДНК на участке, где соседние последовательности соединены общим отрезком DR1 [202]. Таким образом, организация последовательности ДНК вируса HSV-1 принимает вид

$$a_L a_m b - U_L - b' a' n c' - U_S - c a_S,$$

где индекс  $m$  меняется от 0 до некоторого значения больше 10, а индекс  $n$  — от 1 до значения больше 10. Примерно в 50% случаев  $m=1$ .

д) L- и S-компоненты могут быть инвертированы друг относительно друга. Вследствие этого ДНК HSV состоит из четырех изомеров, отличающихся только ориентацией L- и S-компонентов [54, 104]. По всей вероятности, эта инверсия обусловлена сайт-

специфической рекомбинацией в районе  $\alpha$ -последовательности, вызванной продуктами транс-действующих вирусных генов [200—203, 287]. В случае делеции внутренних инвертированных повторов образуется вирус [HSV-1 (F) I358], который размножается в клеточной культуре, но не имеет инвертированных форм ДНК [235]. Тот факт, что значительная часть упакованной ДНК находится в кольцевой форме, позволяет предположить, что внутренние инвертированные повторы и инверсии могут играть определенную роль в процессе упаковки линейной вирусной ДНК (Poffenberger, Roizman, неопубликованные данные).

### Гомология

Подробно исследована гомология между молекулами ДНК разных герпесвирусов, а также гомология между вирусной ДНК и ДНК клетки-хозяина.

Как и следовало ожидать, учитывая вариации размеров молекул и состава оснований, области гомологии обнаруживаются у вирусов, сходных по организации ДНК, антигенной специфичности и биологическим свойствам. Например, вирусы рода *Simplexvirus* (HSV-1, HSV-2, вирус маиллита крупного рогатого скота) содержат гомологичные участки, выявляющиеся даже при очень строгих условиях гибридизации [151, 299]. Подобного рода гомологичные участки найдены у вирусов рода *Lymphocryptovirus* (EBV, герпесвирусы павиана и шимпанзе) [85, 110]. Вместе с тем у ДНК вирусов, принадлежащих разным родам, гомологичные участки вообще или почти не обнаруживаются даже при весьма нестрогой гибридизации [19, 53, 178, 251].

Во многих лабораториях обнаружена гомология между ДНК вируса герпеса и ДНК клеток. Наиболее полные данные получены для EBV [102, 103] и HSV-1 [226, 247]. Конечно, заманчиво приписать этим участкам роль сайтов интеграции или регуляторных сайтов, однако пока никаких данных на этот счет нет. Следует придерживаться общего правила: гомология, обнаруженная с помощью гибридизации, должна быть подтверждена на уровне нуклеотидной последовательности, так как при отжиге (G+C)-богатых областей двухцепочечные структуры могут возникать даже при сильных нарушениях комплементарности пар оснований.

### Вариабельность ДНК герпесвирусов

Обнаружено два вида вариаций в нуклеотидных последовательностях ДНК-герпесвирусов. Это, во-первых, вариации числа тандемных повторов. Так, на участке, соединяющем L- и S-компоненты, и на конце L-компонента число  $\alpha$ -последовательностей оказывается неодинаковым даже в потомстве, полученном из



одной вирусной бляшки [52, 176, 200, 202, 319]. Такие же вариации наблюдаются в tandemных повторах EBV [90, 271]. ДНК HSV, обработанная рестрикционными эндонуклеазами, содержит помимо концевых фрагментов и тех, что размещены между L- и S-компонентами, еще ряд фрагментов переменной длины (например, BamHI B-, E- и N-фрагменты ДНК и HSV-1) [311]. Хотя организация последовательности в этих переменных участках еще не изучена, скорее всего, они содержат tandemные повторы, тем более что флуктуации длин этих участков, по-видимому, носят обратимый характер.

Вариации второго типа проявляются в том, что в какой-то части молекул обнаруживаются сайты рестрикции, которых нет в других молекулах. Соответствующий анализ показал, что два изолята HSV-1 или HSV-2, выделенные из разных источников, никогда не бывают абсолютно тождественными, если между ними нет эпидемиологической связи [33, 261]. При размножении вируса в клеточной культуре распределение сайтов рестрикции приобретает более постоянный характер. Вариации HSV, которые обнаруживаются при герпесе у людей, возможно, отражают способ передачи вируса и его эпидемиологию. HSV способен какое-то время находиться в латентной форме. Если же он активируется, то он может переносить инфекцию. Поскольку вирус постоянно сохраняется в популяции хозяина, он накапливает нелегальные мутации, которые далее передаются потомству. Изменчивость в распределении сайтов рестрикции используют при изучении процессов передачи вируса и его поведения в популяции человека [31—33, 174, 264].

## Полипептиды, входящие в состав вириона

### Число и распределение

По имеющимся данным очищенные вирионы нескольких герпесвирусов содержат от 15 до 35 видов структурных белков [36, 57, 227, 293, 304]. На рис. 29.4 представлен радиоавтограф полипептидов HSV-1 и HSV-2, электрофоретически разделенных в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле. Трудности идентификации структурных полипептидов HSV наиболее подробно рассмотрели Спир и Ройзман [294]. Их можно вкратце суммировать следующим образом: а) число структурных полипептидов весьма велико, причем число молекул на вирион сильно варьирует; б) те, что присутствуют в меньших количествах (миноры), трудно обнаружить на фоне других, хорошо представленных в наборе (мажоры); в) вероятно, некоторые минорные компоненты в действительности представляют собой предшественни-

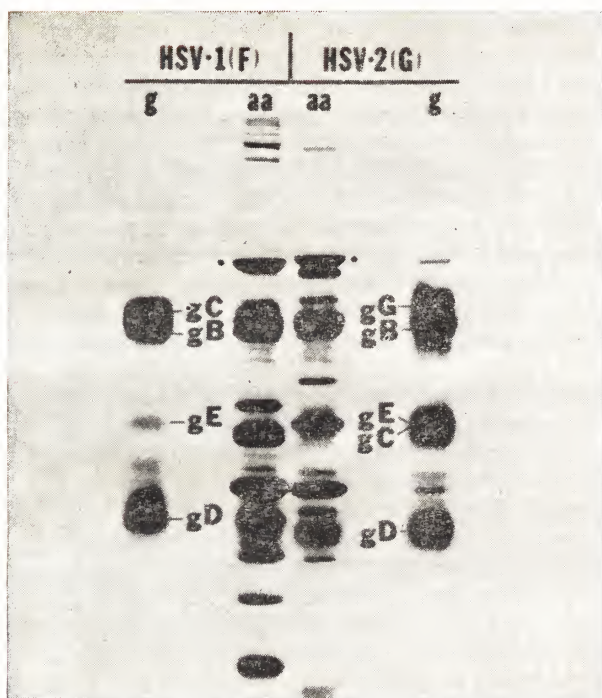


Рис. 29.4. Электрофореграмма полипептидов и гликополипептидов, присутствующих в очищенных вирионах HSV-1 (F) и HSV-2 (G). Вирионы выделены из клеток HEp-2, которые после заражения были инкубированы с  $^{14}\text{C}$ -глюкозамином (g) или с  $^{35}\text{S}$ -метионином (aa). Среди полос, содержащих  $^{35}\text{S}$ -метионин, точками отмечены полосы, соответствующие главному капсидному белку (с мол. массой  $\sim 155\text{K}$ ). Гибсон и Ройзман [88] идентифицировали пять других полипептидов в интервале мол. масс от 25K до 53K, присутствующих в нуклеокапсидах до их одевания в оболочку. На электрофореграмме их положение не указано: это сделать довольно трудно, поскольку они мигрируют вместе с другими полипептидами. Большая часть полипептидов вириона и все гликополипептиды попадают в состав вириона к моменту завершения его одевания в оболочку. Гликополипептиды HSV-1 и HSV-2, имеющие одинаковые буквенные обозначения, родственны в антигенном отношении и кодируются коллинеарными генами (см. обзор [291]). Кажущиеся молекулярные массы гликополипептидов находятся в интервале от 55—60K для gD HSV-1 и HSV-2 до 130K для gC HSV-1 и HSV-2. Обратите внимание, что у gC HSV-1 (gC-1) кажущаяся молекулярная масса заметно выше, чем у gC HSV-2 (gC-2). Другие гомологи в HSV-1 и HSV-2 имеют близкие размеры. Для gG гомологи в HSV-1 и HSV-2 не идентифицированы. Небольшое количество радиоактивной метки, попавшей из  $^{14}\text{C}$ -глюкозамина в немаркированные полосы профиля HSV-2 (G), обусловлены нейтрализацией меченых продуктов катаболизма  $^{14}\text{C}$ -глюкозамина; неизвестно, являются ли эти полипептиды гликопротеинами [336, 337]. (По данным [36].)

ки других компонентов вириона; г) нельзя исключить и того, что некоторые минорные формы вообще не относятся к структурным полипептидам и попали как примесь в процессе очистки. Хотя при двумерном электрофорезе минорные компоненты можно четко выделить из основной массы, структурный состав вириона все равно предстает как достаточно сложный, поскольку при этом обнаруживаются полипептиды, лишь слабо различающиеся по степени их посттрансляционной модификации — гликозилирования, фосфорилирования и т. д. Идентификация аутентичных структурных компонентов вириона может быть в какой-то мере облегчена благодаря получению моноклональных антител к структурным полипептидам и выяснению функции вирусных белков.

Вирионы HSV-1 и HSV-2 содержат на поверхности по крайней мере четыре гликопротеина, обозначаемые как gB (VP7—VP8,5), gC (VP8), gD (VP17 и VP18) и gE (VP12,3 и VP12,6) [36, 106, 290, 291, 295]. Есть сообщение о существовании еще одного гликопротеина HSV-2, gG [266]. Гликопротеины gB, gC, gD и gE сульфатированы [122]. В гликопротеин gE, являющийся Fc-рецептором [13, 222, 223], включается  $^3\text{H}$ -пальмитат, — по видимому, в его составе имеются жирные кислоты [134]. В препаратах очищенного вируса часто присутствуют предшественники вирионных белков, поэтому число полос, которые дают в денатурирующих гелях гликозилированные полипептиды, увеличивается. Функция гликопротеина gC не ясна; известно только, что он обладает СЗб-связывающей активностью [81]; мутанты, лишенные способности экспрессировать gC, остаются жизнеспособными [107, 115], но часто они дополнительно несут мутации *syn*<sup>-</sup>, вызывающие слияние зараженных клеток в поликариоты [148, 186, 255, 270]. Гликопротеин gB, по всей видимости, обеспечивает происходящее на ранних стадиях заражения слияние оболочки вируса с плазматической мембраной [175, 273]. Функции гликопротеинов gD, gE и gG неизвестны.

Капсид состоит по меньшей мере из шести полипептидов [88]. Пустые капсиды, по видимому, меньше по размерам (Furlong, Roizman, неопубликованные данные), и в них недостает по крайней мере одного белка [88, 89], который в ДНК-содержащих капсидах расположен на поверхности [26] и подвергается посттрансляционной модификации (возможно, путем разрезания) во время или сразу после образования оболочки.

Размещение остальных белков вириона неизвестно; вероятно, они располагаются на внутренней стороне оболочки и связывают белки оболочки с тегументом. В очищенном вирусе присутствуют АТРаза и протейнкиназа [63, 171, 268]. Протейнкиназа активируется при разрушении оболочки неионными детергентами и остается в составе капсид-тегументных структур [171].



## Репликация герпесвирусов

### Общее описание репликации

Этот раздел удобно начать с обсуждения общей картины тех событий, из которых складывается репликация герпесвирусов (рис. 29.5).

Заражение начинается с прикрепления вируса к клеточным рецепторам. Вслед за этим происходит слияние оболочки вируса с плазматической или эндосомной мембраной, и лишенный оболочки капсид переносится к порам в ядерной мембране, через которые ДНК вируса попадает в ядро.

Транскрипция и репликация вирусной ДНК, а также сборка капсидов происходят в ядре. Вирусная ДНК транскрибируется в ходе репродуктивного цикла клеточной РНК-полимеразой II при участии на всех стадиях цикла ряда вирусных факторов. Синтез продуктов вирусных генов строго регулируется; экспрессия вирусных генов координирована и представляет собой последовательно развернутый во времени каскад событий. Несколько более 50 хорошо представленных генных продуктов образуют по меньшей мере пять групп, отличающихся друг от друга по характеру

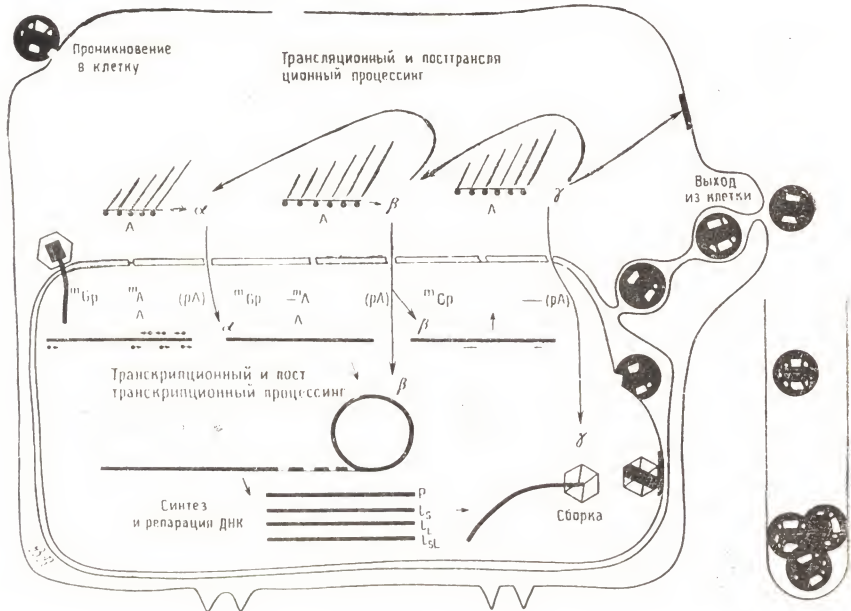


Рис. 29.5. Основные этапы репликативного цикла вируса простого герпеса. Подробнее см. раздел, посвященный описанию хода репликации герпесвирусов.

регуляции синтеза на транскрипционном и посттранскрипционном уровне.

Некоторые из генных продуктов относятся к ферментам или ДНК-связывающим белкам, непосредственно вовлеченным в синтез ДНК. Основная масса вирусной ДНК синтезируется по механизму катящегося кольца. Одновременно могут происходить изомеризация и упаковка ДНК.

Сборка вируса складывается из нескольких стадий: внутри уже сформировавшихся капсидов упаковывается ДНК, вирусы созревают и выходят из клетки через плазматическую мембрану. Весь процесс может длиться от 12 ч для вируса псевдобешенства до более чем 70 ч для цитомегаловируса человека. Репликация HSV тревует около 18 ч.

### Начальные стадии заражения

Относительно событий, предшествующих транскрипции вирусных генов, сведения весьма расплывчаты и фрагментарны, поэтому о них мы подробно говорить не будем. Обычно полагают, что события на начальных стадиях заражения происходят по следующей схеме.

### Прикрепление

Герпесвирусы прикрепляются к специфическим рецепторам на клеточной поверхности, которые еще не идентифицированы. Все представления о специфичности клеток в этом отношении основываются на наблюдениях, подобных тому, что лишь часть клеток человека (например, только В-лимфоциты) содержат рецепторы для EBV [140, 154, 159, 326]. Попытки найти клетки животных, не содержащие рецепторов для HSV, успеха не дали; тем не менее кроме человека «естественному» заражению этим вирусом подвержены только шимпанзе [193]. Ничего не известно и об антирецепторах — тех компонентах поверхности вирусной частицы, которые связываются с рецепторами. Нейтрализация вируса моноклональными или поликлональными антителами к тому или иному гликопротеину [218, 291] еще не может служить средством идентификации вирусных антирецепторов, так как эти антитела могут чисто стерически препятствовать прикреплению вируса или могут вести к инактивации каких-то функций, необходимых на ранних стадиях заражения.

### Проникновение капсида в зараженную клетку

Прикрепление вируса активирует белок, находящийся на поверхности вируса и вызывающий слияние оболочки вируса с плазматической мембраной. При этом молчаливо предполагают

[204], что происходит именно слияние оболочки с плазматической мембраной, а не фагоцитоз. Это согласуется с обнаружением на клеточной поверхности Fc-рецепторов оболочки вириона, в том числе и в тех случаях, когда проникновение вируса не приводит к экспрессии вирусных генов [221]. Присутствие в оболочке вируса активируемого компонента, вызывающего ее слияние с клеточной мембраной, подтверждается также тем, что температурочувствительный мутант HSV-1 по гликопротеину В адсорбируется на клеточной поверхности, не проникая внутрь клетки. Если после такой адсорбции химически индуцировать слияние оболочки вируса с плазматической мембраной, происходит заражение и вирус дает потомство [273]. Утрата чувствительности к нейтрализации, обусловленная проникновением адсорбированного вируса в клетку, происходит очень быстро [123].

#### **Выход вирусной ДНК из капсида**

После проникновения в клетку капсид транспортируется к порам в ядерной мембране, а затем под контролем вирусных факторов вирусная ДНК выходит в нуклеоплазму. Капсиды температурочувствительного мутанта HSV-1 (HFEM) *tsB7* скапливаются у ядерных пор, и выход вирусной ДНК наблюдается только после понижения температуры до пермиссивного уровня [12]. На ранних стадиях заражения вирусом дикого типа у ядерных пор легко обнаруживаются пустые капсиды. Следуя аналогии с заражением аденовирусом, можно предположить, что транспорт капсидов герпесвирусов к ядерным порам осуществляется при участии цитоскелета [47]. Родительская вирусная ДНК накапливается в ядре.

#### **Какие компоненты вириона необходимы для репликации вируса в зараженных клетках?**

Трансфекция пермиссивных клеток интактной депротеинизированной вирусной ДНК приводит к формированию вирусного потомства [94, 164, 282]. Однако удельная инфекционность вирусной ДНК на много порядков ниже по сравнению с инфекционностью вириона, и длится репродуктивный цикл дольше. Кроме того, нет уверенности в том, что трансфекция клеток влечет за собой ту же последовательность событий, которая составляет репродуктивный цикл при заражении клетки вирионом.

Если теперь перейти от ДНК к остальным компонентам вириона, то они выполняют четыре функции: защищают ДНК от внешних воздействий, облегчают проникновение в клетку и, кроме того, способствуют отключению на ранних стадиях заражения синтеза клеточных макромолекул [70, 214—216, 253, 265, 306—



308]. Четвертая функция связана с участием в процессе репликации вируса; этот вывод основан на транс-действии одного из компонентов вириона, индуцирующего гены  $\alpha$  — первую группу экспрессируемых вирусных генов [11, 238]. Поскольку это событие происходит в ядре, можно заключить, что в ядро вместе с ДНК проникают еще какие-то компоненты вириона. Белки, участвующие в этом процессе, не идентифицированы. Престон и Нотарианни [244] наблюдали ADP-рибозилирование капсидного белка VP23 [89, 293] в ядрах зараженных клеток и высказали предположение о транслокации в ядро этого белка. Согласно ранее поступившему сообщению, белок VP23 либо сам является компонентом находящейся в вирионе протейкиназы, либо действует на субстрат, фосфорилируемый или дефосфорилируемый этим ферментом [171].

### Экспрессия вирусных генов

#### Временной режим и условия, необходимые для синтеза генных продуктов

Транскрипция вирусной ДНК происходит в ядре, тогда как все вирусные белки, естественно, синтезируются в цитоплазме. Число полипептидов, синтезируемых в больших количествах и, следовательно, легко поддающихся обнаружению, для HSV не превосходит 50 [45, 116, 208]. Судя по имеющимся данным, можно полагать, что общее их число превышает эту цифру меньше чем в два раза [294, 316].

Экспрессию вирусных генов удобнее всего рассмотреть в связи с системой регуляции. В клетках, подвергшихся продуктивному заражению HSV, регуляция экспрессии вирусных генов имеет три характерных свойства: а) белки HSV образуют по крайней мере пять координированно регулируемых групп — и в отношении необходимых условий их синтеза, и в отношении кинетики синтеза; б) абсолютная скорость синтеза и количество каждого из белков могут варьировать; в) указанные группы белков синтезируются последовательно одна за другой, причем синтез носит каскадный характер [116, 118—120, 161, 230, 292].

Первыми экспрессируются  $\alpha$ -гены, кодирующие пять  $\alpha$ -белков, с номерами 0, 4, 22, 27 и 47. Синтез этих полипептидов достигает максимальной скорости через 2—4 ч после заражения, а затем скорость синтеза уменьшается [118]. Функционирование  $\alpha$ -белков служит необходимым условием для синтеза последующих полипептидов. Так, клетки, зараженные *ts*-мутантами по гену  $\alpha 4$ , при непермиссивной температуре накапливают только  $\alpha$ -полипептиды [158, 245]. Механизм, посредством которого белок  $\alpha 4$  регулирует экспрессию последующих генов, неизвестен. Мутанты по этому гену легко поддаются отбору, причем достаточно большая

часть гена  $\alpha 4$  оказывается затронутой температурочувствительными мутациями [56, 158, 245]. Характерная черта этих мутантов заключается в том, что при переводе зараженных ими клеток из пермиссивных условий в непермиссивные возобновляется синтез  $\alpha$ -белков [241]. Среди  $\alpha$ -генов *ts*-мутациям подвержен только ген  $\alpha 4$ . Однако в экспрессии генов HSV играют роль и другие  $\alpha$ -гены. Например, это относится к гену  $\alpha 22$ . Мутанты HSV-1 (R325 и R328), содержащие делецию этого гена [237], размножаются так же эффективно, как и дикий тип в перевиваемых клетках человека и приматов (I. Halliburton, A. Sears, B. Roizman, неопубликованные данные), но не размножаются в перевиваемых клетках грызунов и в растущих или покоящихся диплоидных клетках человека. В культуре покоящихся диплоидных клеток человека мутанты с делецией гена  $\alpha 22$  неспособны переходить из одной клетки в другую, что может быть связано с нарушением образования оболочки.

Полипептиды групп  $\beta_1$  и  $\beta_2$  достигают максимальной скорости синтеза примерно через 5—7 ч после заражения [118]. Группа  $\beta_1$ , в которую, в частности, входят полипептиды  $\beta_{16}$  (компонент вирусной рибонуклеотидредуктазы) [127] и  $\beta_{18}$  (главный ДНК-связывающий белок), появляются уже на ранних стадиях заражения, и в прошлом их ошибочно включали в группу  $\alpha$ -белков. Они отличаются от  $\alpha$ -белков тем, что для их синтеза необходимо присутствие функционирующего белка  $\alpha 4$ . К полипептидам группы  $\beta_2$  относятся вирусная тимидинкиназа (ТК) и ДНК-полимераза.

$\gamma$ -Полипептиды подразделяются на две группы— $\gamma_1$  и  $\gamma_2$ , — различающиеся по условиям синтеза: если полипептиды группы  $\gamma_1$  могут образовываться в отсутствие синтеза вирусной ДНК, то для образования  $\gamma_2$ -полипептидов необходима амплификация вирусной ДНК [41, 118, 121, 333]. Представителем группы  $\gamma_1$  является белок  $\gamma_{15}$ —главный белок, из которого формируется капсид, а также гликопротеин В. Гликопротеин С является примером белков группы  $\gamma_2$ . Следует подчеркнуть, что группа  $\gamma_1$  существенно отличается от  $\beta$ -полипептидов: хотя синтез  $\gamma_1$ -полипептидов идет и в отсутствие синтеза вирусной ДНК, они образуются в значительно меньших количествах, чем при нормальной продуктивной инфекции, тогда как синтез  $\beta$ -полипептидов несколько не подавляется в присутствии ингибиторов синтеза ДНК и идет нормальным образом в клетках, зараженных ДНК-*ts*-мутантами при непермиссивных температурах. Гены  $\gamma_1$  иногда называют  $\beta$ -генами [44]. Разделение  $\beta$ -генов на группы  $\beta_1$  и  $\beta_2$  и разный уровень требований к экспрессии различных  $\gamma$ -генов послужили главной причиной того, что гены HSV, прежде разделявшиеся на самые ранние, ранние и поздние, теперь стали называться просто  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -генами.

### Транскрипция: структура мРНК HSV

Транскрипция ДНК HSV осуществляется РНК-полимеразой II [42]. Вирусные РНК копируются, метилируются и полиаденилируются; иногда выявляются и неполиаденилированные РНК той же последовательности, что и аденилированные [6, 9, 10, 285, 286, 303]. Внутреннее метилирование характерно для ранних, но не для поздних РНК [10]. мРНК HSV-1 могут различаться и по количеству, и по стабильности [76, 79, 131, 285, 286]. Как правило, мРНК  $\alpha$ -генов более стабильны по сравнению с мРНК  $\gamma$ -генов [333]. Вирусные мРНК могут сохраняться и по окончании трансляции [136, 161, 162].

Хотя мРНК, о которых здесь идет речь, функционируют в клетках высших эукариот, лишь малая часть мРНК HSV-1 подвержена сплайсингу. Открыты гены, перекрывающиеся по 5'- или 3'-концевой последовательности, но таких генов немного [99, 198, 316]. Впрочем, обращает на себя внимание наличие множества сайтов инициации транскрипции отдельных генов HSV [82, 210, 280, 322, 338].

### Функции вирусных генов

#### Функциональная организация генома герпесвирусов

Об организации геномов HSV-1 и HSV-2 уже известно довольно много. Это же утверждение справедливо и для EBV.

Наши знания о функциональной организации геномов вируса HSV в основном опираются на четыре источника данных: анализ рекомбинантов HSV-1 и HSV-2 [187, 207, 208]; восстановление жизнеспособности мутантов путем трансфекции клеток интактной мутантной ДНК и фрагментами ДНК, полученными при действии рестрикционных эндонуклеаз на геном дикого типа [156, 158, 209, 224]; перенос доминантного или поддающегося регистрации маркера из одного генома в другой с помощью фрагментов, отщепленных эндонуклеазами рестрикции [156, 160, 238, 270]; экспрессия генных продуктов очищенной мРНК или фрагментов ДНК в подходящей системе [41, 111, 166, 179, 237, 238]. Наиболее фундаментальный и, по-видимому, универсальный вывод заключается в том, что порядок экспрессии генов во времени не соответствует порядку их расположения в геноме. Приводимые ниже наблюдения касаются организации и структуры генов HSV, но они отражают и некоторые общие черты генов герпес-вирусов.

1.  $\alpha$ -Гены располагаются вблизи концов L- и S-компонентов [1, 139, 179, 208, 210, 246, 320, 322]. Гены  $\alpha 0$  и  $\alpha 4$  находятся в составе инвертированных повторов L- и S-компонентов соответст-



венно, так что в геноме дикого типа они представлены двумя копиями. Но достаточно и одной копии: мутант HSV-1 (1358) с делецией большей части внутреннего инвертированного повтора сохраняет жизнеспособность [235]. *ts*-Мутантов по гену  $\alpha 0$  не обнаружено, а у мутантов по гену  $\alpha 4$  экспрессия *ts*-фенотипа связана с мутациями в обеих копиях [158]. Ген  $\alpha 27$  расположен вблизи внутреннего инвертированного повтора L-компонента. Гены  $\alpha 22$  и  $\alpha 47$  частично занимают область инвертированных повторов S-компонента. Из пяти  $\alpha$ -генов только гены  $\alpha 22$  и  $\alpha 47$  дают мРНК, подвергающиеся сплайсингу; возможно, они перекрываются с другими генами [1, 179, 181, 321, 322].  $\alpha$ -Гены в кольцевой ДНК образуют два кластера: в состав первого входят гены 27, 0, 4 и 22, а в состав второго — гены 47, 4 и 0. Несмотря на такую кластеризацию, каждый  $\alpha$ -ген имеет свою промоторно-регуляторную область и собственные сайты инициации и терминации транскрипции [179—182].

2. Гены  $\beta$  и  $\gamma$  рассеяны по L- и S-компонентам. В настоящее время удалось обнаружить только два кластера функциональных генов, но их реальная роль пока неясна. Так,  $\beta$ -гены, кодирующие ДНК-полимеразу и ДНК-связывающий белок, располагаются вблизи начальной точки репликации ДНК в L-компоненте (см. ниже), тогда как несколько  $\gamma$ -генов, кодирующих мембранные белки, располагаются в пределах уникальных последовательностей S-компонента [167, 266, 270, 323]. Хотя известно несколько случаев перекрывания генов на 3'- или 5'-концах [58, 254, 322], у герпесвирусов примеров такого рода перекрывания, равно как и примеров сплайсинга генов [316], намного меньше по сравнению с аденовирусами и паповавирусами.

3. Среди генов герпесвирусов наиболее полно исследован ген ТК HSV-1 — в основном благодаря легкости обнаружения соответствующей ферментативной активности даже на фоне активности фермента хозяина. Структурные характеристики гена ТК типичны и для генов вируса герпеса, и для генов, экспрессируемых в клетках высших эукариот. Ген ТК содержит 5'-концевую промоторно-регуляторную нетранскрибируемую область; транскрибируемую, но нетранслируемую 5'-последовательность; транскрибируемые и транслируемые последовательности; 3'-концевую транскрибируемую нетранслируемую область и 3'-последовательность, необходимую для полиаденилирования транскрипта. Из структурных свойств гена ТК два представляют особый интерес. Во-первых, имеются два сайта инициации транскрипции — обнаружены мРНК, синтез которых иницируется с того и другого сайта [55, 243, 338]. Роль этих сайтов в экспрессии гена при литической инфекции пока неясна.

Другой интересной особенностью является структура 5'-концевой нетранскрибируемой области. Мак-Найт с соавторами

[195—197] идентифицировали в пределах 150-нуклеотидной области влево от сайта инициации (сайта экпирозания) «проксимальный» цис-действующий сайт и два «дистальных» сайта, которые играют важную роль при конститутивной экспрессии гена ТК и, вероятно, служат знаками пунктуации и являются участками связывания РНК-полимераз и вспомогательных факторов [338]. Цис-сайты со сходной функцией, необязательно идентичные по последовательности, по-видимому, присутствуют и в областях расположения других генов.

### **Синтез и процессинг вирусных белков**

Вирусные белки синтезируются, по-видимому, и на свободных, и на связанных полисомах. Большинство белков, исследованных к настоящему времени, подвергается после синтеза интенсивному процессингу [27, 65, 88, 122, 230, 290]. Процессинг включает в себя разрывы цепи, фосфорилирование, сульфатирование, гликозилирование и т. п. Во многих случаях модификация структуры белка сопровождается переносом белка через мембраны [191]. Имеющиеся данные о процессинге белков и его связи с их функционированием будут подробно изложены в разделе, посвященном свойствам и функциям вирусных белков, а также в разделе, посвященном вирусным гликопротеинам.

Впрочем, процессинг может идти не только потому, что он нужен вирусу, — он может быть обусловлен сходством вирусных белков с природными субстратами клеточных ферментов. Например, гликопротеины HSV-1 и HSV-2 в клетках африканских зеленых мартышек Vero расщепляются протеолитическим ферментом хозяина, тогда как в клетках HEp-2 этого фермента или совсем нет, или он отщепляет меньший фрагмент, чем протеаза в клетках Vero [228, 229]. Хотя размножение вируса идет в клетках Vero не менее интенсивно, чем в клетках HEp-2, было показано, что протеолитический фермент в клетках Vero отщепляет эпитоп на поверхности гликопротеина В, связывающий одно из нейтрализующих моноклональных антител [228, 229].

### **Свойства и функции вирусных белков**

Идентификация новой функции, обнаруживаемой в зараженной вирусом клетке, или идентификация нового белка, выполняющего ту или иную функцию, обычно основана на сочетании биохимических и генетических методов. К сожалению, несмотря на объединенные усилия многих лабораторий, в настоящее время функции многих белков герпесвирусов остаются неизвестными.

Что касается  $\alpha$ -белков, то условно-летальные мутанты найдены только по гену  $\alpha 4$  [56, 156, 241, 245]. У HSV-1 белок  $\alpha 4$  в де-

натурирующем полиакриламидном геле дает три полосы, обозначаемые 4a, 4b и 4c. В клетках, зараженных вирусом дикого типа, быстрее всех мигрирующий компонент 4a имеет кажущуюся мол. массу 160К и после импульсного радиоактивного мечения легко обнаруживается в цитоплазме [230, 328]. Это единственный компонент, который накапливается при непермиссивной температуре в клетках, зараженных некоторыми *ts*-мутантами по гену  $\alpha 4$  [158]. Два других компонента, присутствующие в полосах 4b и 4c, имеют кажущиеся мол. массы 163К и 170К и накапливаются в ядре [230, 328]. Накопление медленно мигрирующих компонентов совпадает по времени с транслокацией белка в ядро и включением в белок добавленного в среду неорганического  $^{32}\text{P}$  [69, 230]. Особенно интересно, что в ходе репродуктивного цикла импульсная метка  $^{32}\text{P}$  может быть введена в состав  $\alpha 4$ -белков спустя заметное время после прекращения синтеза этих белков. Это свидетельствует об обмене фосфата между средой и белком в процессе заражения [328]. Как сообщили Престон и Нотарианни [244], в изолированных ядрах  $\alpha 4$  может подвергаться аденозилрибозилированию. Пока трудно оценить, какое это может иметь значение, поскольку неизвестно, протекает ли эта реакция при размножении вируса. Хотя именно таким аденозилрибозилированием можно объяснить включение в  $\alpha 4$  добавленного в среду неорганического  $^{32}\text{P}$  [230], следует отметить, что ассоциация и диссоциация фосфата с белком характерны для  $\alpha 4$ ,  $\alpha 22$  и  $\alpha 27$  [328], но только для компонента 4c удалось наблюдать аденозилрибозилирование *in vitro*.

Есть сообщение, что  $\alpha 4$  связывается с ДНК лишь в присутствии белков клетки-хозяина [75]. Хэй Р. и Хэй Дж. [101] наблюдали миграцию  $\alpha$ -белков в ядро и их прочное связывание с клеточным хроматином. При физиологических условиях белок  $\alpha 4$ , так же как и белки  $\alpha 0$  и  $\alpha 27$ , имеют низкую растворимость [328; М. Ackerman, В. Roizman, L. Pereira, в печати], поэтому надо специально проверять, происходит ли именно связывание или просто осаждение белка на волокнах ДНК. Ниже будут подробно изложены данные о мутантах с делецией гена  $\alpha 22$ . О функции белков  $\alpha 0$ ,  $\alpha 27$  и  $\alpha 47$  ничего не известно.

Функции нескольких  $\beta$ -белков, по-видимому, связаны с синтезом вирусной ДНК. Белок  $\beta_1 8$  имеет мол. массу  $\sim 120\text{К}$ . Он обладает сродством к одноцепочечной ДНК [248], причем связывание с ней носит кооперативный характер [269]. Мутанты с повреждениями в этом гене неспособны синтезировать вирусную ДНК при непермиссивной температуре [41, 91]. Среди других  $\beta$ -белков можно упомянуть ТК [152], ДНК-полимеразу [239], ДНКазу [113, 146, 147, 206, 209, 242] и рибонуклеотидредуктазу [40, 126, 127, 236]. Гены, кодирующие эти белки, были локализованы на генетических картах. За исключением ДНК-полимеразы [156,



239], перечисленные белки были идентифицированы после их разделения в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

Хотя все эти ферменты дублируют функции клеточных ферментов, по ряду свойств они отличаются от последних. Вирусная ТК, например, характеризуется намного более широким набором субстратов по сравнению с соответствующим клеточным ферментом. Хотя ТК рассматривается как пиримидиндезоксикиназа, в действительности она фосфорилирует и пуринпентозиды, и широкий набор нуклеозидных аналогов, которые клеточная киназа эффективно не фосфорилирует [132, 153, 155]. Эта особенность вирусной ТК послужила основой для широкого использования нуклеозидных аналогов при изучении экспериментальной и естественной герпетической инфекции. Присутствие гена ТК существенно для нормального размножения вируса при экспериментальной инфекции [72, 310], но не в клеточной культуре [152]. Это обстоятельство было использовано в ходе проводимого в последние годы изучения структуры генома HSV [235, 237, 238]. Мутанты с повреждениями в гене ТК подразделяются на несколько групп. Некоторые из них теряют способность синтезировать функционирующую ТК, тогда как другие производят слишком малые количества фермента или производят фермент с более узкой субстратной специфичностью, который не фосфорилирует аналоги, используемые в целях отбора [50, 72, 240, 305]. Некоторые герпесвирусы (например, EBV, CMV) не имеют своей специфической ТК.

ДНК-полимераза и рибонуклеотидредуктаза тоже отличаются от соответствующих клеточных ферментов. ДНК-полимераза послужила объектом особенно многочисленных исследований вследствие ее необычайной чувствительности к ряду соединений, таких, как фосфоноацетат и фосфоноформат. Описаны температурочувствительные мутанты HSV по ДНК-полимеразе [39, 250], некоторые из них устойчивы по отношению к ряду лекарственных препаратов, в том числе к фосфоноацетату [133, 249] и аналогам нуклеозидов (например, ацикловиру) [46], ингибирующим вирусы дикого типа.

$\beta$ -Полипептиды участвуют в отключении синтеза  $\alpha$ -белков и клеточных белков и в индукции  $\gamma$ -генов [118, 120].

Большинство идентифицированных к настоящему времени  $\gamma$ -белков являются компонентами вириона: на долю  $\gamma$ -белков приходится около половины известных продуктов генов HSV. Как указывалось ранее, структурные белки были идентифицированы как компоненты, выделяемые вместе с вирионами и капсидами. Однако определенно известна функция всего лишь нескольких структурных белков. Некоторые структурные белки, синтезируемые на поздних стадиях инфекции, функционируют на ранних

стадиях; один или несколько из таких структурных белков способствуют освобождению вирусной ДНК из капсидов и прохождению ее через ядерные поры [12], участвуют в процессе отключения синтеза клеточных белков сразу после заражения [71, 253] и индуцируют экспрессию  $\alpha$ -генов [11, 238].

#### **Применение генетических методов для идентификации функции генных продуктов**

Ключевым моментом в распознавании функций вируса и в определении расположения кодирующих их генов на генетических картах является использование *ts*-мутантов. К настоящему времени идентифицировано около 30 комплементационных групп (см. [324]), — это уже само по себе выдающееся достижение, если учесть трудности отбора, тестирования и разнесения мутантов по комплементационным группам. *ts*-Мутанты оказались необычайно полезны для картирования генов. Тем не менее этот подход к установлению вирусных функций и картированию соответствующих генов наталкивается на целый ряд трудностей.

Во-первых, многие вирусные гены, по-видимому, не играют существенной роли для размножения вируса в клеточной культуре в неселективных условиях. К ним относятся ген ТК, по крайней мере один из генов гликопротеинов (gC) и, возможно, ген компонента вириона, отвечающего за отключение клеточных синтезов. Несмотря на все попытки ввести условно-летальные мутации по  $\alpha$ -генам, положительного результата удалось добиться только для гена  $\alpha 4$ . Это свидетельствует либо о том, что многие из этих генов несущественны для размножения вируса в клеточной культуре, либо о том, что участки генов, важные для их функции, очень малы. Менее правдоподобное объяснение заключается в том, что почти все мутации такого рода оказываются безусловно-летальными. Как бы то ни было, выяснить функции этих генов путем конструирования условно-летальных мутантов не удалось.

Во-вторых, условно-летальные мутанты (например, *ts*-мутанты), полученные неспецифическими мутагенными воздействиями, часто содержат большое число молчащих нелетальных мутаций как по существенным, так и по несущественным генам. Это не вызывает особых проблем, если можно сопоставить функции гена, затронутого *ts*-мутацией при пермиссивных и непермиссивных температурах. Например, неспособность к синтезу вирусной ДНК при непермиссивной температуре легко обнаруживается даже в присутствии молчащих мутаций, которые меняют характер синтеза белков и при пермиссивных, и при непермиссивных температурах. Проблема становится намного более серьезной, хотя ее часто игнорируют, когда такое сопоставление оказывается невозмож-

ным: например, такие ситуации возникают, когда нужно проверить способность *ts*-мутантов к латентному существованию в геноме животного, температура тела которого непермиссивна для роста таких мутантов.

В-третьих, влияние побочных нелетальных мутаций можно в принципе устранить, если использовать сайт-специфический мутагенез. Так, одним из способов введения специфической мутации является трансфекция клеток интактной вирусной ДНК дикого типа вместе с фрагментом ДНК, содержащим мутантный ген, в результате чего этот ген включается в геном потомства вируса. Описаны случаи, когда геном вируса после такой трансфекции содержал *ts*-повреждения генов в отдаленных сайтах. Это свидетельствует о возможности рекомбинации введенных фрагментов с короткими, частично гомологичными нуклеотидными участками, в результате чего нуклеотидная последовательность в соответствующих сайтах изменяется. Как и следовало ожидать, при этом возможно как возникновение, так и утрата мутации.

В-четвертых, возможность использования *ts*-мутантов частично зависит от эффективности их высевания при пермиссивных и непермиссивных температурах. Мутанты, дающие большую разницу в эффективности высевания вируса при пермиссивных и непермиссивных температурах, могут иметь несколько точечных мутаций. Хотя присутствие множественных мутаций в одном и том же гене не должно оказывать влияния на картирование гена и идентификацию его функции, из-за него могут возникать трудности при картировании функциональных доменов генного продукта.

В-пятых, повреждение, внесенное в областях, принадлежащих одновременно нескольким генам, трудно соотносить с дефектами в функционировании того или иного специфического генного продукта.

Пост и Ройзман [237] предложили способ, с помощью которого можно идентифицировать гены, не существенные для размножения вируса в клеточной культуре. Этот способ, основанный на использовании селективного маркера (например, ТК), заключается в следующем. Путем трансфекции клеток интактной ДНК дикого типа и фрагментом, содержащим делецию по гену ТК, авторы получали потомство вируса HSV-1 с делецией гена ТК (ТК<sup>-</sup>). Далее, для проверки того, является ли какой-либо ген существенным для размножения в клеточной культуре, клетки трансфицировали геномной ДНК ТК<sup>-</sup>-вируса и фрагментом, в котором в тестируемый ген вставлен нормальный ген ТК. Если потомство, отобранное по ТК<sup>+</sup>-фенотипу, несет вставленный ТК-фрагмент в соответствующей части вирусного генома, то это свидетельствует о том, что обрыв тестируемого гена не влечет за собой нарушения существенной функции. В качестве следующего



шага можно удалить весь этот ген или его часть путем совместной трансфекции клеток интактной ДНК, содержащей ТК-вставку, и фрагментом, содержащим делецию в исследуемом гене, с последующим отбором ТК<sup>-</sup>-потомства. Таким способом сконструировали вирусы, содержащие делецию по гену  $\alpha 22$  и провели отбор вирусов, лишенных внутренних инвертированных повторов, в состав которых входили гены  $\alpha 0$  и  $\alpha 4$  [235, 237]. Очевидно, эта процедура применима лишь к несущественным генам, которые не перекрываются с существенными.

Другой потенциально полезный прием заключается во введении в клетки экспрессируемых векторов, содержащих индивидуальные вирусные гены под контролем природных или искусственных промоторов. Примером служит ген ТК, который вводили под контролем собственного и под контролем множества других вирусных и клеточных промоторов [28, 166, 192, 327]. Помимо гена ТК HSV-1 существует ряд других легко экспрессируемых вирусных генов, которые можно вводить в клетки эукариот, в частности несколько генов гликопротеинов [22, 191, 272]. Наконец, с помощью подобного рода экспрессируемых векторов, несущих в себе сигнал амплификации ДНК и энхансерные последовательности, усиливающие транскрипцию генов герпесвирусов, можно получить множество сведений о функциях вирусных генов и подготовить путь к конструированию стабильных мутантов, содержащих делеции специфических генов.

#### **Регуляция экспрессии вирусных генов**

Сложный характер размножения герпесвирусов и наблюдаемая наряду с этим воспроизводимость хода этого процесса уже с давних пор навели на мысль о строгой регуляции всех происходящих при этом событий [256]. Механизм регуляции репликации вирусов остается интереснейшей областью исследований.

Как отмечалось ранее, регуляция экспрессии генов герпесвирусов работает по принципу каскада. В случае HSV он сводится к тому, что продукты  $\alpha$ -генов вызывают индукцию  $\beta$ -генов, продукты  $\beta$ -генов выключают экспрессию  $\alpha$ -генов и индуцируют экспрессию  $\gamma$ -генов, а продукты  $\gamma$ -генов выключают экспрессию  $\beta$ -генов и сразу же вслед за началом нового раунда заражения индуцируют экспрессию  $\alpha$ -генов [11, 12, 118, 120, 238]. Имеющиеся данные указывают, что количество генных продуктов регулируется независимо и процесс регуляции охватывает как транскрипционный, так и посттранскрипционный уровни. В предыдущем разделе были описаны ход синтеза белков в процессе инфекции и свойства некоторых ключевых белков HSV, участвующих в процессах регуляции. Стали известны отдельные стороны регуляции репликации HSV, которые могут служить по меньшей мере ориентирами в изучении общих механизмов репликации.

1. Включение генов HSV содержит в себе три элемента: вирус-специфический транс-действующий сигнальный белок (или несколько белков); цис-действующие регуляторные и промоторные последовательности и целый ряд факторов и ферментов, необходимых для осуществления транскрипции.

2. Транс-действующий сигнал, необходимый для индукции  $\alpha$ -генов, по-видимому, заложен в одном или нескольких структурных белках вируса. Этот вывод следует из того, что химерные гены, состоящие из структурной части гена ТК HSV-1, слитой с  $\alpha$ -промоторными регуляторными областями HSV-1, после того как они встроены в геном клетки и придают ей ТК<sup>+</sup>-фенотип, индуцируются в условиях, которые препятствуют синтезу белков, кодируемых суперинфицирующим вирусом [11, 238]. Все  $\alpha$ -гены содержат два набора общих последовательностей в регуляторных областях (рис. 29.6). Наибольшее внимание привлекают (G+C)-богатые почти идеальные инвертированные повторы, рассеянные в виде многих копий возле гена  $\alpha 27$  и выше сайта начала транскрипции  $\alpha$ -генов [181]. В меньшем числе представлены относительно (A+T)-богатые последовательности, присутствующие в регуляторных областях  $\alpha$ -генов в одной или нескольких копиях [181—183]. Проводимые в настоящее время исследования (Т. Kristie, В. Roizman, неопубликованные данные) указывают, что последовательности, содержащие этот (A+T)-богатый гомолог, наделяют конструкции из промотора и структурной части гена ТК способностью подвергаться регуляции подобно  $\alpha$ -гену; (G+C)-богатые области определяют конститутивный уровень экспрессии генов. Природу и функцию транс-действующего сигнала, а также его способность к взаимодействию с регуляторной последовательностью и (или) с каким-либо клеточным фактором еще предстоит выяснить.

3. По крайней мере одним из транс-действующих белков, необходимых для синтеза  $\beta$ - и  $\gamma$ -белков в ходе инфекции и для амплификации синтеза  $\beta$ - и  $\gamma$ -белков под контролем встроенных в клеточный геном вирусных генов, является белок  $\alpha 4$ . Это подтверждается хотя бы тем, что  $\beta$ -гены, не экспрессируемые интактной ДНК при заражении в отсутствие функционирующего  $\alpha 4$ -белка [55, 157, 172, 241], в то же время экспрессируются, когда присутствуют в клетке в виде резидентных, или «временных», генов [238, 327]. Какая регуляция свойственна  $\beta$ -генам: положительная, отрицательная или та и другая? Ответ на этот вопрос пока неизвестен. Клетки, несущие резидентные  $\beta$ -гены (например, ТК), обычно как раз и отбираются по экспрессии этих генов и поэтому могут быть использованы для отбора клеток, экспрессирующих  $\beta$ -гены в отсутствие продукта гена  $\alpha 4$ . Поступило неожиданное сообщение о том, что белок  $\alpha 4$  и эквивалентный ему продукт вируса псевдобешенства индуцируют не только  $\beta$ -гены





цировать продукты клеточных генов и взаимодействовать с регуляторными последовательностями ДНК, а в случае, когда наблюдается индукция ранних генов аденовируса, белок  $\alpha 4$  выполняет функцию продукта аденовирусного гена *E1A*. Это мнение вызывает возражение по следующим четырем причинам: ранние гены аденовируса могут экспрессироваться и в отсутствие продукта гена *E1A* [21, 212]; мутации по гену *E1A* не являются условно-летальными в отличие от мутаций по гену  $\alpha 4$  HSV и эквивалентному гену вируса псевдобешенства [21, 137]; отсутствие специфичности индуцированных генов не воспроизводится в реципрокных экспериментах — ни аденовирус, ни вирус псевдобешенства не индуцируют  $\beta$ -гены HSV [11]; нет никаких убедительных объяснений тому, что продукты генов вируса герпеса индуцируют только гены, введенные в клетку путем трансфекции, и не индуцируют природные хромосомные гены. Очевидно, ответы на поставленные вопросы приблизят выяснение истинного механизма действия гена  $\alpha 4$  и эквивалентного ему гена вируса псевдобешенства.

4. Пока ничего не известно ни о продукте транс-действующего гена, ни о цис-действующих последовательностях ДНК, вовлеченных в индукцию  $\gamma$ -генов. Сообщалось, что химерные гены, полученные путем слияния регулятора  $\gamma_1$ 5-промотора с геном ТК, на основе которых получена линия клеток с ТК<sup>+</sup>-фенотипом, ведут себя точно так же, как и истинные  $\beta$ -гены [55]. В то же время вставка в ДНК HSV-1  $\gamma_2$ -промотора с 5'-конца в подходящей ориентации относительно структурной части гена ТК превращает этот ген в  $\gamma$ -ген в том плане, что индукция ТК блокируется фосфоацетатом — ингибитором синтеза вирусной ДНК (S. Silver, B. Roizman, в печати). Индукция природной  $\beta$ -ТК не ингибируется, а лишь усиливается фосфоацетатом [170].

5. Представления о системах посттранскрипционного контроля основаны на сообщениях о регуляции процесса транспорта вирусных транскриптов в цитоплазму [138, 139, 161]. Отмечено, например, что степень генетической сложности РНК, накапливающейся в ядрах клеток, зараженных HSV в присутствии циклогексимида и поддерживаемых в среде, содержащей циклогексимид, существенно выше, чем в цитоплазме. Впрочем, четкая интерпретация этих данных пока отсутствует. Например, так и не удалось показать комплементарность РНК в ядрах зараженных клеток, обработанных циклогексимидом, каким-либо  $\beta$ -генам (например, ТК) [172]; поэтому, возможно, накапливающиеся в ядрах транскрипты — это случайные транскрипты с различных участков ДНК, неспецифичные по отношению к  $\beta$ - или  $\gamma$ -генам.

6. Представления о регуляции на уровне трансляции основаны на нескольких наблюдениях. Особо следует отметить, что и подавление синтеза белков хозяина структурными компонентами

вириона сразу после заражения [70, 214, 253], и подавление синтеза продуктов  $\alpha$ -генов появляющимися позднее вирусными факторами [69, 118] относятся к трансляционным событиям — они происходят даже при физической или химической энуклеации клеток. Важный факт установлен в работах Рида и Френкеля [253]: он заключается в том, что структурные компоненты вириона оказывают ингибирующее действие на синтез и клеточных, и  $\alpha$ -белков, поскольку мутанты, вирионы которых неспособны отключать клеточные гены, образуют продукты  $\alpha$ -генов в большем количестве, чем вирусы дикого типа. Высказано предположение, что мРНК генов, отключаемых по мере перехода от экспрессии  $\alpha$ -генов к экспрессии  $\beta$ - и далее  $\gamma$ -генов, остаются связанными с полисомами. Недавно Джонсон и Спир [136] элегантно показали, что функционально активная мРНК гликопротеина D, одного из  $\gamma_1$ -полипептидов, продолжает накапливаться в цитоплазме и после того, как скорость синтеза gD начинает резко падать.

#### **Синтез вирусной ДНК, сборка и выход вируса из зараженной клетки**

##### **Репликация вирусной ДНК**

Отличительной особенностью герпесвирусов, которой нет ни у каких других ядерных ДНК-содержащих вирусов, является необычно большое число кодируемых ими ферментов, вовлеченных в синтез ДНК. Хотя последовательность событий при репликации вирусной ДНК в общих чертах известна, многие детали этого процесса еще предстоит изучить. В клетках, зараженных HSV, синтез вирусной ДНК обнаруживается примерно через 3 ч после заражения и продолжается по меньшей мере 9—12 ч [263, 265]. ДНК синтезируется в ядре, но о кинетике синтеза ДНК судить трудно из-за возрастания пула дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, достигающего насыщения на ранних стадиях заражения. Поэтому, если измерять скорость синтеза вирусной ДНК путем использования меченых дезоксирибонуклеозидов, она оказывается максимальной уже на относительно ранних стадиях инфекции.

По крайней мере в клетках, зараженных HSV-1, репликации подвергается лишь небольшая часть всей ДНК родительского вируса. Импульсно-меченая ДНК не содержит свободных концов, т. е. она имеет либо кольцевую, либо конкатемерную («голова-хвосту») форму [129, 130]. Меченые предшественники включаются в молекулы, осаждающиеся с большей скоростью, чем интактная двухцепочечная ДНК. В щелочном градиенте плотности сахарозы полосы меченой ДНК в основном обнаруживаются в позициях, характерных для небольших одноцепочечных фрагмен-

тов. Сразу же после начала синтеза вирусной ДНК в полосах, соответствующих по положению в градиенте вирусной ДНК, обнаруживается родительская ДНК, а также кольцевые и разветвленные линейные формы. Далее по ходу репродуктивного цикла эти формы ДНК сменяются крупными, быстро седиментирующими клубками ДНК. Имеющиеся данные указывают, что ДНК герпесвирусов, по крайней мере на поздних стадиях инфекции, реплицируется по механизму катящегося кольца [17, 129].

Первые данные о положении начальной точки репликации ДНК в геноме HSV были получены при изучении структуры дефектных геномов [80, 275]. Позднее в качестве начальных точек репликации стали рассматривать те последовательности, которые должны входить в состав фрагмента ДНК HSV и обеспечивать его амплификацию в пермиссивных клетках, подвергшихся трансфекции этим фрагментом вместе с интактной вирусной ДНК в роли помощника [201, 313]. Если принять это определение, то HSV-1 и, вероятно, HSV-2 содержат три начальные точки репликации ДНК. Две из них попадают в инвертированную *c*-последовательность S-компонента [8, 176, 201, 301, 302, 313], тогда как третья находится в середине L-компонента вблизи генов, кодирующих главный ДНК-связывающий белок ( $\beta$ 8) и ДНК-полимеразу [78, 177, 289].

Секвенирование начала репликации S-компонента [210, 302, 320] дало основание сделать вывод о том, что все функции начала репликации сосредоточены в отрезке ДНК длиной 90 бп, в состав которого входит почти идеально палиндромная АТ-богатая последовательность длиной 45 бп. Поскольку участки начала репликации в составе S-компонента содержатся внутри повторов, можно ожидать, что они идентичны. Относительно нуклеотидной последовательности начала репликации в составе L-компонента известно очень немного, однако никакой гомологии фрагментов, содержащих начальные точки репликации в S- и L-компонентах, не обнаружено. Практически ничего не известно о том, как функционируют эти участки. Особенно важно установить, функционируют ли какие-то из них или все они непосредственно в процессе репликации вирусной ДНК и насколько они эквивалентны или подчинены друг другу. Отметим здесь, что в некоторых случаях петли в реплицирующейся ДНК HSV не совпадают с расположением начальных точек репликации, как они определены выше [15]. Начальные точки репликации в составе S-компонента располагаются выше сайтов инициации транскрипции  $\alpha$ -генов 4, 22 и 47 [1, 179, 322] и в то же время отличаются от главных последовательностей, регулирующих экспрессию этих генов [43, 181—183, 201].



### Созревание (или процессинг) ДНК и сборка вирионов

Сборка вирионов герпесвирусов состоит из следующих стадий.

1. Сборка пустых капсидов, накапливающихся в ядре.
2. Новосинтезированная вирусная ДНК процессируется и упаковывается в уже сформировавшиеся пустые капсиды. Созревание, или процессинг, включает в себя разрыв вирусной ДНК, не имевшей свободных концов, — кольцевой или конкатемерной; возможна также инверсия L- и S-компонентов (характерная для HSV). В клетках, зараженных вирусом псевдобешенства, выявлена генетическая связь между разрывом и упаковкой вирусной ДНК [163]; однако очевидно, что у мутантов с повреждениями в системе, обеспечивающей разрыв ДНК в ходе ее созревания, и должен быть нарушен процесс упаковки ДНК. Белки, ответственные за эту функцию, пока не обнаружены. Правда, были предварительные сообщения об идентификации белков, специфически связывающихся с *a*-последовательностями, и о содержащемся в капсиде белке VP19C (ICP32), который связывается с вирусной ДНК [25]. Отсюда возникло предположение, что для разрыва и упаковки ДНК необходима вирусная *a*-последовательность [176]; оно получило дальнейшее подкрепление в ходе изучения дефектных геномов; в настоящее время показано, что упаковывается правильно нарезанная ДНК, разрыв при нарезании приходится на *a*-последовательность и *a*-последовательность необходима для размножения дефектных геномов [302; Spaete, Frenkel, личное сообщение].

Согласно упрощенной модели, основанной на структуре концов ДНК HSV-1, разрыв молекул-предшественников с образованием нужных для упаковки фрагментов стандартной длины происходит во второй дистальной последовательности DR1 на конце S-компонента, причем эта последовательность DR1 — общая для двух соседних *a*-последовательностей [200]. Что же случится, если соединяющий фрагмент будет содержать только одну *a*-последовательность? Один из правдоподобных ответов состоит в том, что такой вариант исключен, поскольку созревание новосинтезированной ДНК всегда включает в себя амплификацию *a*-последовательностей (L. Deiss, N. Frenkel, в печати). Возможно, инверсия L- и S-компонентов HSV является следствием этого же процесса.

3. Сформировавшиеся в ядре ДНК-содержащие капсиды прикрепляются к модифицированным внутренним ламеллам ядерной мембраны, из которых формируется оболочка вируса. Подчеркнем, что речь идет именно о ДНК-содержащих капсидах, поскольку, как это следует из электронно-микроскопических наблюдений, образование оболочки вокруг пустых капсидов происходит

очень редко. Правда, отсюда вовсе не следует, что ДНК, содержащаяся в «одетых» капсидах, всегда соответствует по длине полноразмерной молекуле ДНК HSV [262]. Отметим в этой же связи данные Влажны и др. [314], согласно которым, капсиды с фрагментами ДНК HSV, по размеру меньшими, чем полный геном, удерживаются в ядре. Все это можно объяснить, если вспомнить, что поверхность ДНК-содержащих капсидов покрыта молекулами белка VP22 (ICP35) [25, 89], которого нет в пустых капсидах. Напрашивается предположение, что капсиды, лишенные этого белка, не способны связываться с модифицированными внутренними участками ядерной мембраны.

4. Эти модифицированные участки на электронно-микроскопических снимках выглядят как достаточно толстые выпуклые или вогнутые структуры. Поскольку одетые в оболочку вирионы не содержат клеточных мембранных белков, можно считать эти модифицированные участки агрегатами вирусных мембранных белков, к числу которых, вероятно, относятся и вирусные белки, локализованные на наружной поверхности, и якорные и тегументные белки, находящиеся на внутренней поверхности.

5. Относительно места, где вирионы герпесвирусов покрываются оболочкой, нет единого мнения. Почти все исследователи согласны, что начальная стадия этого процесса протекает на внутренних ламеллах. Вместе с тем многие авторы наблюдали капсиды на модифицированных участках цитоплазматических мембран в момент их одевания (или раздевания) и отсюда сделали вывод, что оболочка вируса формируется в цитоплазме. Стэкпоул [298] выдвинул идею, согласно которой капсиды одеваются в оболочку на внутренних ламеллах, на внешних ламеллах выходят из оболочки и снова одеваются, когда попадают в эндоплазматический ретикулум; выход вируса в межклеточное пространство либо сопровождается новым одеванием вируса уже на плазматической мембране, либо представляет собой процесс слияния пузырьков, несущих в себе одетый в оболочку вирус, с плазматической мембраной. Большое число частиц, одеваемых в оболочку в цитоплазме, — достаточно серьезный факт, с которым нельзя не считаться.

Следует отметить, что на тонких срезах формирование оболочки вокруг капсида на ядерной мембране наблюдается исключительно редко; видимо, процесс одевания капсида в оболочку протекает очень быстро. Поскольку каждый капсид, одевающийся в оболочку в цитоплазме, должен пройти через процесс одевания и раздевания в ходе переноса через ядерную мембрану, несовпадение числа капсидов, одеваемых в оболочку на ядерных и цитоплазматических мембранах, может объясняться либо тем, что скорость одевания капсида на ядерных мембранах много выше, чем на цитоплазматических, либо тем, что капсиды, скапливаю-

щиеся на цитоплазматических мембранах, являются артефактом и представляют собой капсиды, теряющие оболочку, или капсиды, одевание которых было прервано. Таким образом, принципиально важный вопрос о том, являются ли полуодетые цитоплазматические капсиды промежуточными продуктами процесса одевания или просто дефектными структурами, частично утратившими оболочку, пока остается без ответа. Интересно, что полуодетые цитоплазматические капсиды преобладают в линиях непрерывно делящихся клеток и сравнительно редки в первичных диплоидных клетках человека.

### **Выход из клетки**

В цитоплазме интактные одетые вирусные частицы обычно находятся в везикулах, окруженных мембранами [51, 123]. Это вполне естественно, поскольку структуры, окруженные слоем гликопротеинов, вряд ли могут быть стабильны в незащищенном виде в цитоплазме. На нескольких электронных микрофотографиях были видны трубчатые структуры; возможно, в некоторых клетках рассматриваемые структуры представляют собой цистерны цитоплазматического ретикулума, соединенные с плазматической мембраной [277]. Высказывалось предположение, что выход вируса из клетки идет по механизму, близкому к обратному фагоцитозу, — имеется в виду направление движения, а не его механика. Как предполагают Джонсон и Спир [134] на основании опытов с использованием мონензина, вирионы секретируются через аппарат Гольджи, следуя по тому же пути, что и секретируемые растворимые белки [135].

### **Роль вирусных гликопротеинов в процессах сборки, приобретения инфекционной активности и выхода вируса из зараженных клеток**

В клетках, зараженных HSV, все идентифицированные к настоящему времени вирусные мембранные белки оказались гликозилированы. В то же время в клетках, зараженных EBV и другими герпесвирусами, найден негликозилированный мембранный белок.

Согласно имеющимся данным, биосинтез гликопротеинов герпесвирусов в общих чертах идет так же, как и биосинтез гликозилированных белков эукариотических клеток [34, 291]. Негликозилированные предшественники мембранных белков герпесвирусов синтезируются на полисомах, связанных с шероховатым эндоплазматическим ретикуломом. Процесс гликозилирования включает в себя и трансляционные, и посттрансляционные события. Так, N-гликозилирование инициируется переносом ранее



сформировавшихся гликанов [(глюкоза)<sub>3</sub> — манноза — (N-ацетилглюкозамин)<sub>2</sub>] с долихолфосфатного липидного переносчика на остатки аспарагина в составе последовательности Asp — X — Thr/Ser новосинтезированного полипептида (на месте X может стоять любая аминокислота) [173, 188, 309]. После этого олигосахаридные цепи по мере прохождения через аппарат Гольджи укорачиваются гликозидазами, маннозидазами и т. д., что приводит к образованию полиманнозильных цепей, часто называемых высокоманнозными гликанами [125, 296]. Эти гликаны под действием гликозилтрансфераз чаще всего превращаются в гликаны сложного типа, содержащие пентасахаридный ствол [(манноза)<sub>3</sub> — (N-ацетилглюкозамин)<sub>2</sub>] и ряд боковых ответвлений, имеющих состав: сиаловая кислота — галактоза — глюкозамин. Фукоза в тех случаях, когда она присутствует, присоединяется к уже сформированным цепям [124]. О-Гликозилирование наблюдается реже [35, 134, 213, 220, 283]; оно инициируется переносом N-ацетилгалактозамина на гидроксильную группу треонина или серина, после чего в аппарате Гольджи добавляются еще галактозамин, N-ацетилглюкозамин, фукоза и сиаловая кислота [20]. Степень гликозилирования и конкретная структура сложных гликанов зависят от конформации белка вблизи сайта гликозилирования, поскольку от этого зависит доступность белка ферментам, участвующим в процессинге. Конформационными характеристиками белка может объясняться и гетерогенность гликанов, присоединенных к данному белку.

Информация о структуре гликанов HSV собрана в обзорах [34, 291]. Известно, например, что в составе гликопротеинов, кодируемых HSV-1, найдены и высокоманнозные N-связанные, и O-связанные, и сложные гетерогенные гликаны. Пока нет данных, которые указывали бы на то, что для превращения негликозилированных предшественников в полностью гликозилированные молекулы необходим синтез вирус-специфических ферментов, но нельзя исключить, что вирусом кодируются по крайней мере некоторые ферменты, сходные по функции с ферментами хозяев.

Пока ничего не известно о роли O-гликозилирования гликопротеинов герпесвирусов и об условиях, необходимых для его протекания. N-гликозилирование необходимо для инфекционности вируса. Это следует из того, что туникамицин, блокирующий N-гликозилирование, препятствует одеванию вируса в оболочку [225, 231, 232]. Превращение высокоманнозных гликанов в гликаны сложного типа, по-видимому, необходимо для выхода вируса из зараженной клетки, но не для самой инфекционности [35, 134, 160, 279]. Индуцируемое HSV слияние клеток тоже требует условий, благоприятствующих формированию сложных гликанов, но в этом случае неясно, должны ли сложные гликаны входить в состав вирусных гликопротеинов, присутствовать на поверхности

зараженных клеток или на поверхности как зараженных, так и тех незараженных клеток, с которыми сливаются зараженные при формировании поликариоцитов.

## **Судьба зараженной клетки**

### **Общие замечания**

Клетки, продуктивно заражаемые герпесвирусами, не выживают. Почти с самого начала репродуктивного цикла зараженные клетки подвергаются крупным структурным и биохимическим изменениям, в конце концов приводящим к их разрушению.

### **Структурные изменения**

Как это подробно описано в обзоре [262], самые ранние изменения происходят с ядрышком; оно увеличивается в размере, смещается ближе к ядерной мембране и в конце концов распадается на фрагменты. Параллельно происходит маргинация клеточных хромосом, а на более поздних стадиях заражения наблюдаются искажение формы ядра и его сегментация. Такого рода искажения и появление разного рода «выростов» ранее ошибочно принимали за amitotическое деление [142, 278]. Маргинация хромосом не всегда сопровождается их разрывами, о которых сообщали многочисленные исследователи, но они возможны [262].

Для поздних стадий заражения характерно изменение вида клеточных мембран, в особенности ядерных. На внутренней поверхности мембраны (обращенной к нуклеоплазме или цитоплазме, но не к просвету между внутренними и внешними ламеллами или к просвету цистерн эндоплазматического ретикулума) происходит накопление материала и формирование утолщений вдоль мембраны. В конце концов утолщенные участки ядерной мембраны сливаются и накладываются один на другой, создавая впечатление редупликации мембран.

### **Метаболизм клеточных макромолекул**

Для клеток, зараженных герпесвирусами, характерно быстрое выключение метаболизма собственных макромолекул уже на ранней стадии заражения. Например, прекращается синтез клеточной ДНК, как это наблюдается при заражении вирусом псевдобешенства [18, 144], HSV [5, 263], EHV-1 [219] и EBV [86, 217]. Очень быстро падает также синтез клеточных белков [265, 306, 307] и одновременно прекращается их гликозилирование [106, 109, 295].

Влияние продуктивного заражения на метаболизм клеточной РНК представляется более разнообразным [262]. Спад синтеза РНК относится не ко всем видам РНК. Синтез 4S-РНК ингибируется сильнее, чем синтез РНК, более крупных чем 28S. Хотя синтез рибосомной РНК почти полностью подавляется, синтез и метилирование 45S-предшественника рибосомной РНК продолжается [317]. Синтез нерибосомных РНК тоже продолжается, но в синтезе белков эти РНК не используются [317].

#### **Роль продуктов вирусных генов в подавлении метаболизма клеточных макромолекул**

Имеющиеся данные, относящиеся к экспрессии клеточных функций в зараженной клетке, в основном касаются синтеза клеточных белков в клетках, зараженных HSV. Из этих данных следует, что отключение синтеза белков протекает по меньшей мере в две стадии.

Первая стадия, которую вначале подробно изучали Фенвик и Уокер [70] и затем Нишиока и Силверстейн [214—216], протекает при участии структурных вирусных белков и не требует синтеза новых белков. Например, отключение синтеза клеточных белков при заражении HSV наблюдается в клетках, подвергшихся физической или химической энуклеации [69]; способность к такому отключению сохраняется у вируса, очищенного в градиенте плотности, но утрачивается, если очищенный вирус подвергся тепловой инактивации или нейтрализации антителами. Отключение клеточного синтеза идет намного быстрее и эффективнее при заражении HSV-2 по сравнению с HSV-1; это побудило исследователей к поиску с помощью рекомбинантов HSV-1×HSV-2 генетического локуса, обеспечивающего ускорение процесса отключения при заражении вирусом HSV-2 [71]. Вероятно, самым сильным свидетельством в пользу существования структурных компонентов, отключающих синтез клеточных белков, послужило выделение *vhs*-мутантов (от англ. *virion host shutoff*) HSV, неспособных отключать клеточный синтез полипептидов [253].

Вторая стадия наступает после того, как начинается синтез новых белков [69, 118, 120, 214, 216, 284]. Отключение клеточного синтеза совпадает по времени с синтезом  $\beta$ -белков, но не исключена также возможность, что оно все же определяется продуктами  $\gamma$ -, а не  $\beta$ -генов.

Механизм, с помощью которого HSV различает синтез вирусных и клеточных белков и отключает последний, неизвестен. В серии изысканных экспериментов Нишиока и Силверстейн показали, что в клетках, трансформированных вирусом лейкоза Френд после его индукции диметилсульфоксидом, деградация глобиновой мРНК сопряжена с синтезом белков HSV, тогда как распад кле-



точных полисом после заражения от него не зависит [214—216]. Рид и Френкель [253] предположили, что на ранних стадиях отключение синтеза белков компонентами вириона происходит без заметной дискриминации между синтезом вирусных и клеточных белков; они обнаружили, что в клетках, зараженных *vhs*-мутантами, синтез  $\alpha$ -белков тоже усиливается. Это может означать, что на первой стадии действуют вирусные факторы, подавляющие синтез любых белков, и лишь на более поздней стадии появляются продукты вирусных генов, способные к дифференцированному подавлению синтеза клеточных, но не вирусных белков. Физиологическая роль ранней стадии подавления синтеза белков остается неясной; дело еще в том, что в природных условиях заражение клеток происходит при очень низком отношении числа вирусных частиц к числу клеток, тогда как для экспериментального изучения подавления вириона компонентами синтеза клеточных белков используют множественность заражения порядка 10 БОЕ/клетка ( $>500$  вирионов/клетка).

Вообще говоря, наблюдавшиеся до сих пор изменения клеточного метаболизма большей частью представляют собой крупные нарушения метаболизма макромолекул; возможно, что они отражают вызванные вирусом специфические изменения функции определенных макромолекул. Одним из них, возможно, является обусловленное вирусом усиление фосфорилирования одного из двух полипептидов, ассоциированных с малыми субчастицами рибосом [70, 149]. Сообщалось также, что один из стабильных клеточных белков с мол. массой  $\sim 130\text{K}$  после заражения теряет способность связываться с ДНК и что утрата этой способности сопряжена с действием поздних ( $\beta$  или  $\gamma$ ) генов HSV [3]. Пока трудно сказать, какое значение могут иметь все эти наблюдения, но они открывают новые возможности для отбора мутантов, с помощью которых в дальнейшем может проясниться значение для репродукции вируса происходящих при заражении модификаций.

#### **Вызванные вирусом изменения клеточных мембран**

Первые подозрения о модификации герпесвирусами клеточных мембран возникли после того, как были обнаружены мутанты вируса В обезьяны, а также PSV и HSV, которые отличались от вирусов дикого типа по их воздействию на клетки. Если вирусы дикого типа обычно приводят к округлению и агрегации клеток, то мутантные вирусы вызывают слияние клеток в поликариоты [255]. На основании этих наблюдений возникла идея о том, что герпесвирусы меняют структуру и антигенные свойства клеточных мембран; и действительно, в дальнейшем были получены прямые данные об изменении антигенной специфичности цитоплазматических и плазматических мембран зараженных клеток

[263, 274] и о присутствии в них вирусных гликопротеинов [108, 109, 295].

Наше знание относительно созревания, метаболизма и функционирования вирусных гликопротеинов пока не позволяют судить о том, зачем нужно присутствие вирусных гликопротеинов на поверхности зараженной клетки; случайное ли это явление, обусловленное естественным перемещением связанных с мембранами белков, или это выработанная в ходе эволюции защита вируса от нейтрализации антителами при его переносе из клетки в клетку. Как бы то ни было, у зараженной клетки изменяется антигенная специфичность, и она становится мишенью для разрушающего действия иммунной системы.

Существует группа мутаций *syn*<sup>-</sup>, обуславливающих изменения в характере взаимодействия плазматических мембран зараженных клеток, что отражается на их «социальном поведении»; на генетических картах они оказались распределены по нескольким генетически независимым участкам генома HSV. Лишь одна из них локализована в области гена, кодирующего гликопротеин [186, 270], хотя можно полагать, что все они расположены в генах, кодирующих белки, способные связываться с мембранами. Множественность генетических локусов, мутации которых вызывают слияние зараженных клеток, может отражать то обстоятельство, что вирусные мембранные белки образуют многокомпонентные комплексы, и мутация, затрагивающая любой из компонентов комплекса, может изменять структуру и функцию всего комплекса в целом [270].

Важное значение могут иметь и вторичные проявления изменений в клеточных мембранах. В частности, в нескольких работах [141, 317, 335] сообщалось об утечке макромолекул из клеток после их заражения вирусами PSV и HSV. При изучении клеток, зараженных вирусом псевдобешенства [141, 335], было сделано заключение, что эта утечка вызвана продуктами вирусных генов, появляющимися через 4 ч после заражения. Повышенная утечка макромолекул должна сопровождаться изменением в распределении электролитов, а также проникновением в клетку молекул, для которых прежде она была непроницаема. Изменение в распределении электролитов должно отразиться на значении трансмембранного потенциала [83]. Возможность усиленного притока молекул извне была показана в серии недавно выполненных опытов с использованием бензгидразона [1H-бенз(f)инден-1,3(2H)дион-бис-амидиногидразон] — ингибитора гликозилирования в клетках, зараженных HSV [312]. Действие ингибитора легко обнаруживается по тому, что в его присутствии мутанты *syn*<sup>-</sup> уже не вызывают слияния клеток. Пока найден лишь один мутант, устойчивый к этому ингибитору, причем эта устойчивость в одних клетках проявляется, а в других нет. Особенно обращают

на себя внимание свойственные этому мутанту задержка или снижение скорости синтеза продуктов  $\gamma$ -генов; это согласуется с гипотезой о том, что ингибитор проникает в клетки, зараженные чувствительным к нему вирусом, но при наличии мутаций, приводящих к задержке или снижению скорости синтеза мембранных белков, его приток в клетку оказывается затруднен и гликозилирование вирусных гликопротеинов идет обычным образом [312].

Замедление и последующее прекращение синтеза белков в зараженной клетке можно, по крайней мере частично, объяснить модификацией клеточных мембран, вызывающей утечку макромолекул и изменение концентрации электролитов. Однако, учитывая то обстоятельство, что изучение метаболизма макромолекул на ранних стадиях заражения обычно проводят в условиях, когда на клетку приходится более 500 вирионов и оболочки этих вирионов после проникновения вирусов оказываются в составе плазматической мембраны [221], встает вопрос, не связан ли дисбаланс электролитов с подобного рода сосредоточением вирусных оболочек в отдельных участках плазматической мембраны, и не этим ли объясняется подавление синтеза клеточных и вирусных белков, которое обычно приписывают действию компонентов вириона.

## Литература

1. Anderson K. P., Costa R., Holland L., Wagner E. (1980). Characterization of HSV-1 RNA present in the absence of de novo protein synthesis, *J. Virol.*, **34**, 9—27.
2. Armstrong J. A., Pereira H. G., Andrewes C. H. (1961). Observations of the virus of infectious bovine rhinotracheitis and its affinity with the herpesvirus group, *Virology*, **14**, 276—285.
3. Arsenakis M., Roizman B. (1984). A post  $\alpha$  gene turns off the capacity of host protein to bind DNA in cells infected with herpes simplex virus 1, *J. Virol.*, **49**, 813—818.
4. Asher Y., Heller M., Becker Y. (1969). Incorporation of lipids into herpes simplex virus particles, *J. Gen. Virol.*, **4**, 65—76.
5. Aurelian L., Roizman B. (1965). Abortive infection of canine cells by herpes simplex virus. II. The alternative suppression of synthesis of interferon and viral constituents, *J. Mol. Biol.*, **11**, 539—548.
6. Bachenheimer S. L., Roizman B. (1972). Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. VI. Polyadenylic acid sequences in viral messenger ribonucleic acid, *J. Virol.*, **10**, 875—879.
7. Barahona H. H., Melendez L. V., King N. W., Daniel M. D., Fraser C. E. O., Preville A. E. (1973). Herpesvirus aotus type 2: A new viral agent from owl monkeys (*Aotus trivirgatus*), *J. Infect. Dis.*, **127**, 171—178.
8. Barnett J. W., Eppstein D. A., Chan H. W. (1983). Class I defective herpes simplex virus DNA as a molecular cloning vehicle in eucaryotic cells, *J. Virol.*, **48**, 384—395.
9. Bartkoski M. J., Jr., Roizman B. (1976). RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. XIII. Differences in the methylation patterns of viral RNA during the reproductive cycle, *J. Virol.*, **20**, 583—588.



10. Bartkoski M. J., Jr., Roizman B. (1978). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VII. Inhibition of internal methylation of mRNA late in infection, *Virology*, **85**, 146—156.
11. Batterson W., Roizman B. (1983). Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of  $\alpha$  genes, *J. Virol.*, **46**, 371—377.
12. Batterson W., Furlong D., Roizman B. (1983). Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Further characterization of a *ts* mutant defective in release of viral DNA and in other stages of viral reproductive cycle, *J. Virol.*, **45**, 397—407.
13. Baucke R. B., Spear P. G. (1979). Membrane proteins specified by herpes simplex virus. V. Identification of an Fc-binding glycoprotein, *J. Virol.*, **32**, 779—789.
14. Bayliss G. J., Marsden H. S., Hay J. (1975). Herpes simplex virus: DNA-binding proteins in infected cells and in the virus structure, *Virology*, **68**, 124—134.
15. Becker Y., Dym H., Sarov I. (1968). Herpes simplex virus DNA, *Virology*, **36**, 184—192.
16. Ben-Porat T., Kaplan A. S. (1971). Phospholipid metabolism of herpesvirus-infected and uninfected rabbit kidney cells, *Virology*, **45**, 252—264.
17. Ben-Porat T., Tokazewski S. (1977). Replication of herpesvirus DNA. II. Sedimentation characteristics of newly synthesized DNA, *Virology*, **79**, 292—301.
18. Ben-Porat T., Rakusanova T., Kaplan A. S. (1971). Early functions of the genome of herpes virus. II. Inhibition of the formation of cell-specific polyosomes, *Virology*, **46**, 890—899.
19. Ben-Porat T., Veach R. A., Ihara S. (1983). Localization of the regions of homology between the genomes of herpes simplex virus type 1 and pseudorabies virus, *Virology*, **127**, 194—204.
20. Berger E. C., Buddecke E., Kamerling J. P., Kobata A., Paulson J. C., Vliegenthart J. F. C. (1982). Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans, *Experientia*, **38**, 1129—1162.
21. Berk A. J., Lee F., Harrison T., Williams J., Sharp P. A. (1979). Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs, *Cell*, **17**, 935—944.
22. Berman P. W., Dowbenko D., Lasky L., Simonsen C. C. (1983). Detection of antibodies to herpes simplex virus with a continuous cell line expressing cloned glycoprotein D, *Science*, **222**, 524—527.
23. Beyer T. A., Sadler J. E., Rearick J. I., Paulson J. C., Hill R. L. (1981). Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure-function relationship, *Adv. Enzymol.*, **52**, 123—175.
24. Biswal N., Murray B. K., Benyesh-Melnick M. (1974). Ribonucleotides in newly synthesized DNA of herpes simplex virus, *Virology*, **61**, 87—99.
25. Braun D. K., Batterson W., Roizman B. (1984). Identification and genetic mapping of a herpes simplex virus capsid protein which binds DNA, *J. Virol.*, **50**, 645—648.
26. Braun D. K., Roizman B., Pereira L. (1984). Characterization of posttranslational products of herpes simplex virus gene 35 proteins binding to the surface of full but not empty capsids, *J. Virol.*, **49**, 142—153.
27. Braun D., Pereira L., Norrild B., Roizman B. (1983). Application of denatured, electrophoretically separated, and immobilized lysates of herpes simplex virus-infected cells for the detection of monoclonal antibodies and for studies of the properties of viral proteins, *J. Virol.*, **46**, 103—112.
28. Brinster R. L., Chen H. Y., Warren R., Sarthy A., Palmiter R. D. (1982). Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs, *Nature*, **296**, 39—42.

29. *Buchman T. G., Roizman B.* (1978). Anatomy of bovine mammillitis DNA. I. Restriction endonuclease maps of four populations of molecules that differ in the relative orientation of their long and short components, *J. Virol.*, **25**, 395—407.
30. *Buchman T. G., Roizman B.* (1978). Anatomy of bovine mammillitis DNA. II. Size and arrangements of the deoxynucleotide sequence, *J. Virol.*, **27**, 239—254.
31. *Buchman T. G., Roizman B., Nahmias A. J.* (1979). Exogenous genital reinfection with herpes simplex virus 2 demonstrated by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA, *J. Infect. Dis.*, **140**, 295—304.
32. *Buchman T. G., Roizman B., Adams C., Stover H.* (1978). Restriction endonuclease fingerprinting of herpes simplex DNA: A novel epidemiology tool applied to a nosocomial outbreak, *J. Infect. Dis.*, **138**, 488—498.
33. *Buchman T. G., Simpson T., Nosal C., Roizman B., Nahmias A. J.* (1980). The structure of herpes simplex virus DNA and its application to molecular epidemiology, *Ann. NY Acad. Sci.*, **354**, 279—290.
34. *Compadelli-Fiume G., Serafini-Cessi F.* (1984). Processing of the oligosaccharide chains of herpes simplex virus type 1 glycoproteins. In: *Herpesviruses*, Vol. 3, ed. by B. Roizman, Plenum Press, New York (in press).
35. *Compadelli-Fiume G., Poletti L., Dall'Olio F., Serafini-Cessi F.* (1982). Infectivity and glycoprotein processing of herpes simplex virus type 1 grown in a ricine-resistant cell line deficient in *N*-acetylglucosaminyl transferase 1. *J. Virol.*, **43**, 1061—1071.
36. *Cassai E. N., Sarmiento M., Spear P. G.* (1975). Comparison of the virion proteins specified by herpes simplex virus type 1 and 2, *J. Virol.*, **16**, 1327—1331.
37. *Cebrian J., Bucchini D., Sheldrick P.* (1983). Endless viral DNA in cells infected with channel catfish virus, *J. Virol.*, **46**, 405—412.
38. *Cebrian J., Kaschka-Dierich C., Berthelot N., Sheldrick P.* (1982). Inverted repeat nucleotide sequences in the genomes of Marek disease virus and the herpesvirus of the turkey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 555—558.
39. *Chartrand P., Crumpacker C. S., Schaffer P. A., Wilkie N. M.* (1980). Physical and genetic analysis of the herpes simplex virus DNA polymerase locus, *Virology*, **103**, 311—325.
40. *Cohen J. C., Henry B. E., Randall C. C., O'Callaghan D. J.* (1977). Ribonucleotide reductase activity in hydroxyurea resistant herpesvirus replication, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **155**, 395—399.
41. *Conley A. F., Knipe D. M., Jones P. C., Roizman B.* (1981). Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutants produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of  $\gamma$  polypeptides, *J. Virol.*, **37**, 191—206.
42. *Constanzo F., Compadelli-Fiume G., Foa-Tomas L., Cassai E.* (1977). Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase II. *J. Virol.*, **21**, 996—1001.
43. *Cordingley M. G., Campbell M. E. M., Preston C. M.* (1983). Functional analysis of a herpes simplex virus type 1 promoter: Identification of far-upstream regulatory sequences, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2347—2365.
44. *Costa R. H., Devi B. G., Anderson K. P., Gaylord B. H., Wagner E. K.* (1981). Characterization of a major late herpes simplex virus type 1 mRNA, *J. Virol.*, **38**, 483—496.
45. *Courtney R. J., Powell K. L.* (1975). Immunological and biochemical characterization of polypeptides induced by herpes simplex virus type 1 and 2. In: *Oncogenesis and Herpesviruses*, Vol. II, ed. by G. de-The et al., p. 63, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
46. *Crumpacker C. S., Chartrand P., Subak-Sharpe J. H., Wilkie N. M.* (1980). Resistance of herpes simplex virus to acycloguanosine-genetic and physical analysis, *Virology*, **105**, 171—184.

47. Dales S., Chardonnet Y. (1973). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum, *Virology*, **56**, 465—483.
48. Daniel M. D., Melendez L. V., King N. W., Barahona H. H., Fraser C. E. O., Garcia F. G., Silva D. (1973). Isolation and characterization of a new virus from owl monkeys: Herpesvirus aotus type 3, *Am. J. Phys. Anthropol.*, **38**, 497—500.
49. Daniel M. D., Melendez L. V., King N. W., Fraser C. E. O., Barahona H. H., Hung R. D., Garcia F. G. (1971). Herpesvirus aotus: A latent herpesvirus from owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) — Isolation and characterization, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **138**, 835—845.
50. Darby G., Field H. J., Salisbury S. A. (1981). Altered substrate specificity of herpes simplex virus thymidine kinase confers acyclovir resistance, *Nature*, **289**, 81—83.
51. Darlington R. W., Moss L. H., III (1969). The envelope of herpesvirus, *Proc. Med. Virol.*, **11**, 16—45.
52. Davison A. J., Wilkie N. M. (1981). Nucleotide sequences of the joint between the L and S segments of herpes simplex virus type 1 and 2, *J. Gen. Virol.*, **55**, 315—331.
53. Davison A. J., Wilkie N. M. (1983). Location and orientation of homologous sequences in the genomes of five herpes viruses, *J. Gen. Virol.*, **64**, 1927—1941.
54. Delius H., Clements J. B. (1976). A partial denaturation map of herpes simplex virus type 1 DNA: Evidence for inversions of the unique DNA regions, *J. Gen. Virol.*, **33**, 125—133.
55. Dennis D., Smiley J. R. (1984). Transactivation of a late herpes simplex virus promoter, *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 544—551.
56. Dixon R. A. F., Schaffer P. A. (1980). Fine structure mapping and functional analysis of temperature-sensitive mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate early protein VP175, *J. Virol.*, **36**, 189—203.
57. Dolyniuk M., Pritchett R., Kieff E. (1976). Proteins of Epstein-Barr virus. I. Analysis of the polypeptides of purified enveloped Epstein-Barr virus, *J. Virol.*, **17**, 935—949.
58. Draper K. G., Frink R. J., Wagner E. K. (1982). Detailed characterization of an apparently unspliced  $\beta$  herpes simplex virus type 1 gene mapping in the interior of another, *J. Virol.*, **44**, 1123—1128.
59. Dumas A. M., Geelen J. L. M. C., Maris W., Van der Noordaa J. (1980). Infectivity and molecular weight of varicella-zoster virus DNA, *J. Gen. Virol.*, **47**, 233—235.
60. Ebeling A., Keil G., Nowak B., Fleckenstein B., Berthelot N., Sheldrick P. (1983). Genome structure and virion polypeptides of the primate herpesvirus—herpesvirus aotus type 1 and 3. Comparison with human cytomegalovirus, *J. Virol.*, **45**, 715—726.
61. Edson C. M., Thorley-Lawson D. A. (1983). Synthesis and processing of the three major envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus, *J. Virol.*, **46**, 547—556.
62. Epstein M. A. (1962). Observations on the mode of release of herpes virus from infected HeLa cells, *J. Cell. Biol.*, **12**, 589—597.
63. Epstein M. A., Holt S. J. (1963). Adenosine triphosphatase activity at the surface of mature extracellular herpes virus, *Nature*, **198**, 509—510.
64. Epstein M. A., Henle W., Achong B. G., Barr Y. M. (1965). Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma, *J. Exp. Med.*, **121**, 761—770.
65. Erickson J. S., Kaplan A. S. (1973). Synthesis of proteins in cells infected with herpesvirus. IX. Sulfated proteins, *Virology*, **55**, 94—102.



66. Falk L., Deinhardt F., Nonoyama M., Wolfe L. G., Bergholz C., Lapin B., Yakovleva L., Agrba V., Henle G., Henle W. (1976). Properties of a baboon lymphotropic herpesvirus related to Epstein-Barr virus, *Int. J. Cancer*, **18**, 798—807.
67. Falke D., Siegert R., Vogell W. (1959). Elektronenmikroskopische Befunde zur Frage der Doppelmembranbildung des Herpes-simplex-virus, *Arch. Ges. Viroforsch.*, **9**, 484—496.
68. Feldman L. T., Imperiale M. J., Nevins J. R. (1982). Activation of early adenovirus transcription by the herpesvirus immediate early gene: Evidence for a common cellular control factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4952—4956.
69. Fenwick M., Roizman B. (1977). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VI. Synthesis and modification of viral polypeptides in enucleated cells, *J. Virol.*, **22**, 720—725.
70. Fenwick M. L., Walker M. J. (1978). Suppression of the synthesis of cellular macromolecules by herpes simplex virus, *J. Gen. Virol.*, **41**, 37—51.
71. Fenwick M., Morse L. S., Roizman B. (1979). Anatomy of herpes simplex virus DNA. XI. Apparent clustering of functions effecting rapid inhibition of host DNA and protein synthesis, *J. Virol.*, **29**, 825—827.
72. Field H. J., Wildy P. (1978). The pathogenicity of thymidine kinase-deficient mutants of herpes simplex virus in mice, *J. Hyg. (Lond.)*, **81**, 267—277.
73. Fleckenstein B., Bornkamm G. W., Mulder C., Werner F.-J., Daniel M. D., Falk L. A., Delius H. (1978). Herpesvirus atele DNA and its homology with herpesvirus saimiri nucleic acid, *J. Virol.*, **25**, 361—373.
74. Fong C. K. Y., Tenser R. B., Hsiung G. D., Gross P. A. (1973). Ultrastructural studies of the envelopment and release of guinea pig herpes-like virus in cultured cells, *Virology*, **52**, 468—477.
75. Freeman M. J., Powell K. L. (1982). DNA-binding properties of a herpes simplex virus immediate early protein, *J. Virol.*, **44**, 1084—1087.
76. Frenkel N., Roizman B. (1972). Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus: Control of transcription and of RNA abundance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2654—2659.
77. Frenkel N., Roizman B. (1972). Separation of the herpesvirus deoxyribonucleic acid on sedimentation in alkaline gradients, *J. Virol.*, **10**, 565—572.
78. Frenkel N., Locker H., Vlazny D. A. (1980). Studies of defective herpes simplex viruses, *Ann. NY Acad. Sci.*, **354**, 347—370.
79. Frenkel N., Silverstein N. S., Cassai E., Roizman B. (1973). RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. VII. Control of transcription and of transcript abundancies of unique and common sequences of herpes simplex 1 and 2, *J. Virol.*, **11**, 886—892.
80. Frenkel N., Locker H., Batterson W., Hayward G., Roizman B. (1976). Anatomy of herpes simplex DNA. VI. Defective DNA originates from the S component, *J. Virol.*, **20**, 527—531.
81. Friedman H. M., Cohen G. H., Eisenberg R. J., Seidel C. A., Cines D. B. (1984). Glycoprotein C of HSV-1 functions as a C3B receptor on infected endothelial cells, *Nature*, **309**, 633—635.
82. Frink R. J., Anderson K. P., Wagner E. K. (1981). Herpes simplex virus type 1 HindIII fragment L encodes spliced and complementary mRNA species, *J. Virol.*, **39**, 559—572.
83. Fritz M. E., Nahmias A. J. (1972). Reversed polarity in transmembrane potentials of cells infected with herpesviruses, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139**, 1159—1161.
84. Furlong D., Swift H., Roizman B. (1972). Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core, *J. Virol.*, **10**, 1071—1074.
85. Gerber P., Pritchett R. F., Kieff E. D. (1976). Antigens and DNA of a chimpanzee agent related to Epstein-Barr virus, *J. Virol.*, **19**, 1090—1099.

86. Gergely L., Klein G., Ernberg I. (1971). Host cell macromolecular synthesis in cells containing EBV-induced early antigens. Studies by combined immunofluorescence and radioautography, *Virology*, **45**, 22—29.
87. Gibbs E. P. J., Rweyemamu M. M. (1977). Bovine herpesviruses, *Vet. Bull.*, **47**, 417—425.
88. Gibson W., Roizman B. (1972). Proteins specified by herpes simplex virus. VIII. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2, *J. Virol.*, **10**, 1044—1052.
89. Gibson W., Roizman B. (1974). Proteins specified by herpes simplex virus. X. Staining and radiolabeling properties of B-capsid and virion proteins in polyacrylamide gels, *J. Virol.*, **13**, 155—165.
90. Given D., Kieff E. (1978). DNA of Epstein-Barr virus. IV. Linkage map of restriction endonuclease fragments of the B95-8 and W91 strains of Epstein-Barr virus, *J. Virol.*, **28**, 524—542.
91. Godowski P. J., Knipe D. M. (1983). Mutations in the major DNA-binding protein gene of herpes simplex virus type 1 results in increased levels of viral gene expression, *J. Virol.*, **47**, 478—486.
92. Goodheart C., Plummer G. (1974). The densities of herpes viral DNAs. In: *Progress in Medical Virology*, Vol. 19, ed. by J. L., Melnick, p. 324, S. Karger, Basel, Switzerland.
93. Grafstrom R. H., Alwine J. C., Steinhart W. L., Hill C. W., Hyman R. W. (1975). The terminal repetition of herpes simplex virus DNA, *Virology*, **67**, 144—157.
94. Graham F. L., Velihaisen G., Wilkie N. M. (1973). Infectious herpesvirus DNA, *Nature (Lond.)*, **245**, 265—266.
95. Gravell M. (1971). Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. X. Comparison of herpes-type viruses associated with Lucke tumor-bearing frogs, *Virology*, **43**, 730—733.
96. Green M. R., Treisman R., Maniatis T. (1983). Transcriptional activation of cloned human  $\beta$ -globin genes by viral immediate early gene products, *Cell*, **35**, 137—148.
97. Gruter W. (1924). Das Herpesvirus, seine aetiologische und klinische Bedeutung, *Muench Med. Wochenschr.*, **71**, 1058—1060.
98. Gustafsson D. P. (1970). Pseudorabies. In: *Diseases of Swine*, 3rd ed., edited by H. W. Dunne, pp. 337—355, Iowa State University Press.
99. Hall L. M., Draper K. G., Fluck R. J., Carter R. H., Wagner E. K. (1982). Herpes simplex virus mRNA species mapping in EcoRI fragment I, *J. Virol.*, **43**, 594—607.
100. Hamparian V. V., Hilleman M. R., Kettler A. (1963). Contributions to characterization and classification of animal viruses, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **112**, 1040—1052.
101. Hay R. T., Hay J. (1980). Properties of herpesvirus-induced «immediate early» polypeptides, *Virology*, **104**, 230—234.
102. Hayward S. D., Lazarowitz S. G., Hayward G. S. (1982). Organization of the Epstein-Barr virus DNA molecule: II. Fine mapping of the boundaries of the internal repeat cluster of B95-8 and identification of additional small tandem repeats adjacent to the HR-1 deletion, *J. Virol.*, **43**, 201—213.
103. Hayward S. D., Nøgee L., Hayward G. S. (1980). Organization of repeated regions within the Epstein-Barr virus DNA molecule, *J. Virol.*, **33**, 507—521.
104. Hayward G. S., Jacob R. J., Wadsworth S. C., Roizman B. (1975). Anatomy of herpes simplex virus DNA: Evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short segments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4243—4247.
105. Hayward G. S., Reyes G. R., Gavis E. R., McKnight S. L. (1981). Identification, cloning, and sequencing of HSV thymidine kinase genes. In: *Her-*

- pesvirus DNA: Developments in Molecular Virology, Vol. 1, ed. by Y. Becker, pp. 271—306, Martinus, Nijhoff, Boston.
106. *Heine J. W., Roizman B.* (1973). Proteins specified by herpes simplex virus. IX. Contiguity of host and viral proteins in the plasma membrane of infected cells, *J. Virol.*, **11**, 810—813.
  107. *Heine J. W., Honess R. W., Cassai E., Roizman B.* (1974). Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strains, *J. Virol.*, **14**, 640—651.
  108. *Heine U. I.* (1974). Intranuclear viruses. In: *The Cell Nucleus*, ed. by Busch, p. 489, Academic Press, New York.
  109. *Heller M., Dambaugh T., Kieff E.* (1981). Epstein-Barr virus DNA. IX. Variation among viral DNAs from producer and nonproducer infected cells, *J. Virol.*, **38**, 632—648.
  110. *Heller M., Gerber P., Kieff E.* (1982). DNA of herpesvirus PAN, a third member of the Epstein-Barr virus-herpesvirus papio group, *J. Virol.*, **41**, 931—939.
  111. *Herz C., Roizman B.* (1983). The  $\alpha$  promoter regulator-ovalbumin chimeric gene resident in human cells is regulated like the authentic  $\alpha 4$  gene after infection with herpes simplex virus 1 mutants in  $\alpha 4$  gene, *Cell*, **33**, 145—151.
  112. *Hirsch I., Vonka V.* (1974). Ribonucleotides linked to DNA of herpes simplex type 1, *J. Virol.*, **13**, 1162—1168.
  113. *Hoffman P. J., Cheng Y.* (1978). The deoxyribonuclease induced after infection of KB cells by herpes simplex virus type 1 or 2, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3557—3562.
  114. *Hoffman P. J., Cheng Y.* (1979). DNase induced after infection of KB cells by herpes simplex virus type 1 or type 2, *J. Virol.*, **32**, 449—457.
  115. *Hoggan M. D., Roizman B.* (1959). The isolation and properties of a variant of herpes simplex producing multinucleated giant cells in monolayer cultures in the presence of antibody, *Am. J. Hyg.*, **70**, 208—219.
  116. *Honess R. W., Roizman B.* (1973). Proteins specified by herpes simplex virus. XI. Identification and relative molar rates of synthesis of structural and non-structural herpesvirus polypeptides in infected cells, *J. Virol.*, **12**, 1346—1365.
  117. *Honess R. W., Roizman B.* (1974). The regulation of herpes simplex virus protein synthesis. In: *The Mechanisms of Virus Disease*, ed. by W. S. Robinson and C. F. Fox, pp. 455—492, W. A. Benjamin, Menlo Park, Calif.
  118. *Honess R. W., Roizman B.* (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three group of viral proteins, *J. Virol.*, **14**, 8—19.
  119. *Honess R. W., Roizman B.* (1975). Proteins specified by herpes simplex virus. XIII. Glycosylation of viral polypeptides, *J. Virol.*, **16**, 1308—1326.
  120. *Honess R. W., Roizman B.* (1975). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: Sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1276—1280.
  121. *Honess R. W., Watson D. H.* (1977). Herpes simplex virus resistance and sensitivity to phosphonoacetic acid, *J. Virol.*, **21**, 584—600.
  122. *Hope R. G., Marsden H. S.* (1983). Processing of glycoproteins induced by herpes simplex virus type 1: Sulphation and nature of the oligosaccharide linkages, *J. Gen. Virol.*, **64**, 1943—1953.
  123. *Huang A. S., Wagner R. R.* (1964). Penetration of herpes simplex virus into human epidermoid cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **116**, 863—869.
  124. *Hubbard S. C., Ivatt R. J.* (1981). Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 555—583.
  125. *Hunt L. A., Etchison J. R., Summers D. F.* (1978). Oligosaccharide chains are trimmed during synthesis of the envelope glycoprotein of vesicular stomatitis virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 754—758.
  126. *Huszar D., Bacchetti S.* (1981). Partial purification and characterization of



- the ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus infection of mammalian cells, *J. Virol.*, **37**, 580—588.
127. *Huszar D., Bacchetti S.* (1983). Is ribonucleotide reductase the transforming function of herpes simplex virus 2? *Nature*, **302**, 76—79.
  128. *Illtis J. P., Oakes J. E., Hyman R. W., Rapp F.* (1977). Comparison of the DNAs of varicella-zoster viruses isolated from clinical cases of varicella and herpes zoster, *Virology*, **82**, 345—352.
  129. *Jacob R. J., Roizman B.* (1977). Anatomy of herpes simplex virus DNA. VIII. Properties of the replicating DNA, *J. Virol.*, **23**, 394—411.
  130. *Jacob R. J., Morse L. S., Roizman B.* (1979). Anatomy of herpes simplex virus DNA. XIII. Accumulation of head to tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA, *J. Virol.*, **29**, 448—457.
  131. *Jacquemont B., Roizman B.* (1975). Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus: Characterization of viral high molecular weight nuclear RNA, *J. Gen. Virol.*, **29**, 155—165.
  132. *Jamieson A. T., Subak-Sharpe J. H.* (1974). Biochemical studies on the herpes simplex virus-specified deoxypyrimidine kinase activity, *J. Gen. Virol.*, **24**, 481—492.
  133. *Jofre J. T., Schaffer P. A., Parris D. S.* (1977). Genetics of resistance to phosphonoacetic acid in strain KOS of herpes simplex type 1, *J. Virol.*, **23**, 833—836.
  134. *Johnson D. C., Spear P. G.* (1982). Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells, *J. Virol.*, **43**, 1102—1112.
  135. *Johnson D. C., Spear P. G.* (1983). O-Linked oligosaccharides are attached to herpes simplex virus glycoproteins in the goldi apparatus, *Cell*, **32**, 987—997.
  136. *Johnson D. C., Spear P. G.* (1984). Evidence for translational regulation of herpes simplex virus type 1 gD expression, *J. Virol.*, **51**, 389—394.
  137. *Jones N., Shenk T.* (1979). An adenovirus 5 early gene product funktion regulates expression of other early viral genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3665—3669.
  138. *Jones P., Roizman B.* (1979). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. IX. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated, *J. Virol.*, **31**, 299—314.
  139. *Jones P. C., Hayward G. S., Roizman B.* (1977). Anatomy of herpes simplex virus DNA. VI.  $\alpha$  RNA is homologous to noncontiguous sites in both L and S components of viral DNA, *J. Virol.*, **21**, 268—276.
  140. *Jönsson V., Wells A., Klin G.* (1982). Receptors for the complement C3d component and the Epstein-Barr virus are quantitatively coexpressed on a series of B-cell lines and their derived somatic cell hybrids, *Cell. Immunol.*, **72**, 263—276.
  141. *Kamiya T., Ben-Porat T., Kaplan A. S.* (1965). Control of certain aspects of the infective process by progeny viral DNA, *Virology*, **26**, 577—589.
  142. *Kaplan A. S., Ben-Porat T.* (1959). The effect of pseudorabies virus on the nucleic acid metabolism and on the nuclei of rabbit kidney cells, *Virology*, **8**, 352—366.
  143. *Kaplan A. S., Ben-Porat T.* (1960). The incorporation of C14-labeled nucleosides into rabbit kidney cells infected with pseudorabies virus, *Virology*, **11**, 12—17.
  144. *Kaplan A. S., Ben-Porat T.* (1963). The pattern of viral and cellular DNA synthesis in pseudorabies virus infected cells in the logarithmic phase of growth, *Virology*, **19**, 205—214.

145. Kawamura H., King D. J., Anderson D. P. (1969). A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys, *Avian Dis.*, **13**, 853—863.
146. Keir H. M. (1968). Virus-induced enzymes in mammalian cells infected with DNA-viruses. In: *The Molecular Biology of Viruses*, ed. by L. V. Crawford and M. G. P. Stoker, pp. 67—99, Cambridge University Press, Cambridge.
147. Keir H. M., Gold E. (1963). Deoxyribonucleic acid nucleotidyltransferase and deoxyribonuclease from cultured cells infected with herpes simplex virus, *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 263—276.
148. Keller J. M., Spear P. G., Roizman B. (1970). The proteins specified by herpes simplex virus. III. Viruses differing in their effects on the social behavior of infected cells specify different membrane glycoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 865—869.
149. Kennedey I. M., Stevely W. S., Leader D. P. (1981). Phosphorylation of ribosomal proteins in hamster fibroblasts infected with pseudorabies virus or herpes simplex virus, *J. Virol.*, **39**, 359—366.
150. Kieff E. D., Bachenheimer S. L., Roizman B. (1971). Size, composition and structure of the DNA of subtypes 1 and 2 herpes simplex virus, *J. Virol.*, **8**, 125—129.
151. Kieff E. D., Hoyer B., Bachenheimer S. L., Roizman B. (1972). Genetic relatedness of type 1 and type 2 herpes simplex virus, *J. Virol.*, **9**, 738—745.
152. Kit S., Dubbs D. R. (1963). Acquisition of thymidine kinase activity by herpes simplex infected mouse fibroblast cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 55—59.
153. Kit S., Dubbs D. R. (1965). Properties of deoxythymidine kinase partially purified from noninfected and virus-infected mouse fibroblast cell, *Virology*, **26**, 16—27.
154. Klein G., Yefenof E., Falk K., Westman A. (1978). Relationship between Epstein-Barr virus (EBV) production and the loss of the EBV receptor/complement receptor complex in a series of sublines derived from the same original Burkitt's lymphoma, *Int. J. Cancer*, **21**, 552—560.
155. Klemperer H. G., Haynes G. R., Sheddon W. I. H., Watson D. H. (1967). A virus-specific thymidine kinase in BHK 21 cells infected with herpes simplex virus, *Virology*, **31**, 120—128.
156. Knipe D. M., Ruyechan W. T., Roizman B. (1979). Molecular genetics of herpes simplex virus. III. Fine mapping of a genetic locus determining resistance to phosphonoacetate by two methods of marker transfer, *J. Virol.*, **29**, 698—704.
157. Knipe D. M., Ruyechan W. T., Honess R. W., Roizman B. (1979). Molecular genetics of herpes simplex virus. IV. The terminal  $\alpha$  sequences of the L and S components are obligatorily identical and constitute a part of the structural gene mapping predominantly in the S component, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4534—4538.
158. Knipe D. M., Ruyechan W. T., Roizman B., Halliburton I. W. (1978). Molecular genetics of herpes simplex virus. Demonstration of regions of obligatory and non-obligatory identity in diploid regions of the genome by sequence replacement and insertion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3896—3900.
159. Koide N., Wells A., Volsky D., Shapiro I., Klein G. (1981). The detection of Epstein-Barr virus receptors utilizing radiolabelled virus, *J. Gen. Virol.*, **54**, 191—195.
160. Kousoulas K. G., Pellett P. E., Pereira L., Roizman B. (1984). Mutations affecting conformation or sequence of neutralizing epitopes identified by reactivity of viable plaques segregate from *syn* and *ts* domains of HSV-1(F) gB gene, *Virology*, **135**, 379—394.
161. Kozak M., Roizman B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: Nuclear retention of non-translated viral RNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4322—4326.

162. Kozak M., Roizman B. (1975). RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. IX. Evidence for accumulation of abundant symmetric transcripts in nuclei, *J. Virol.*, **15**, 36—40.
163. Ladin B. F., Blankenship M. L., Ben-Porat T. (1980). Replication of herpesvirus DNA. V. The maturation of concatemeric DNA of pseudorabies virus to genome length is related to capsid formation, *J. Virol.*, **33**, 1151—1164.
164. Lando D., Ryhiner M. L. (1969). Pouvoir infectieux du DNA d'Herpes virus hominis en culture cellulaire, *C. R. Acad. Sci.*, **269**, 527.
165. Landon J. E., Ellis L. B., Zeve V. H., Fabrizio D. P. (1968). Herpes-type virus in cultured leukocytes from chimpanzees, *J. Natl. Cancer Inst.*, **40**, 181—192.
166. Lang J. C., Wilkie N. M., Spandidos D. A. (1983). Characterization of eukaryotic transcriptional control signals by assay of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase, *J. Gen. Virol.*, **64**, 2679—2696.
167. Lee G. T. Y., Para M. F., Spear P. G. (1982). Location of the structural genes for glycoproteins gD and gE and for other polypeptides in the S component of herpes simplex virus type 1 DNA, *J. Virol.*, **43**, 41—49.
168. Lee G. T. Y., Pogue-Geile K. L., Pereira L., Spear P. G. (1982). Expression of herpes simplex virus glycoprotein C from a DNA fragment inserted into the thymidine gene of this virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6612—6616.
169. Lee L. F., Armstrong R. L., Nazerian K. (1972). Comparative studies of six avian herpesviruses, *Avian Dis.*, **16**, 799—805.
170. Leiden J. M., Buttyan R., Spear P. G. (1976). Herpes simplex virus gene expression in transformed cells. I. Regulation of the viral thymidine kinase gene in transformed L cells by products of superinfecting virus, *J. Virol.*, **20**, 413—424.
171. Lemaster S., Roizman B. (1980). Herpes simplex virus phosphoproteins. II. Characterization of the virion protein kinase and of the polypeptides phosphorylated in the virion, *J. Virol.*, **35**, 798—811.
172. Leung W.-C., Dimock K., Smiley J., Bacchetti S. (1980). HSV thymidine kinase transcripts are absent from both nucleus and cytoplasm during infection in the presence of cycloheximide, *J. Virol.*, **36**, 361—365.
173. Li E., Tabas I., Kornfeld S. (1978). The synthesis of complex type oligosaccharides. I. Structure of the lipid-linked oligosaccharide precursor of the complex type oligosaccharides of the vesicular stomatitis virus G protein, *J. Biol. Chem.*, **253**, 7762—7770.
174. Linneman C. C., Jr., Buchman T. G., Light I. J., Ballard J. L., Roizman B. (1978). Transmission of herpes simplex virus type 1 in a nursery for the newborn: Identification of viral isolates by DNA fingerprinting, *Lancet*, **1**, 964—966.
175. Little S. P., Jofie J. T., Courtney R. J., Schaffer P. A. (1981). A vision associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex virus type 1, *Virology*, **115**, 149—160.
176. Locker H., Frenkel N. (1979). Bam I, Kpn I and Sal I restriction enzyme maps of the DNAs of herpes simplex virus strains Justin and F: Occurrence of heterogeneities in defined regions of the viral DNA, *J. Virol.*, **32**, 424—441.
177. Locker H., Frenkel H., Halliburton I. (1982). Structure and expression of class II defective herpes simplex virus genomes encoding infected cell polypeptide number 8, *J. Virol.*, **43**, 574—593.
178. Ludwig H. O., Biswal N., Benyesh-Melnick M. (1972). Studies on the relatedness of herpesviruses through DNA-DNA hybridization, *Virology*, **49**, 95—101.
179. Mackem S., Roizman B. (1980). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: Transcription-initiation sites and domains of  $\alpha$  genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7122—7126.



180. Mackem S., Roizman B. (1981). Regulation and herpes virus macromolecular synthesis: Temporal order of transcription of a  $\alpha$  genes is not dependent on the stringency of inhibition of protein synthesis, *J. Virol.*, **40**, 319—322.
181. Mackem S., Roizman B. (1982). Differentiation between  $\alpha$  promoter and regulator regions of herpes simplex virus I: The functional domains and sequence of a movable  $\alpha$  regulator, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4917—4921.
182. Mackem S., Roizman B. (1982). Regulation of  $\alpha$  genes of herpes simplex virus: The  $\alpha$  27 promoter-thymidine kinase chimeric is positively regulated in converted L cells, *J. Virol.*, **43**, 1015—1023.
183. Mackem S., Roizman B. (1982). Structural features of the  $\alpha$  gene 4, 0, and 27 promoter-regulatory sequences which confer  $\alpha$  regulation on chimeric thymidine kinase genes, *J. Virol.*, **44**, 939—949.
184. Madin S. H., York C. J., McKercher D. G. (1956). Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus, *Science*, **124**, 721—722.
185. Manservigi R. (1974). Method for isolation and selection of temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus, *Appl. Microbiol.*, **27**, 1034—1040.
186. Manservigi R., Spear P. G., Buchan A. (1977). Cell fusion induced by herpes simplex virus is promoted and suppressed by different viral glycoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3913—3917.
187. Marsden H. S., Stow N. D., Preston V. G., Timbury M. C., Wilkie N. M. (1978). Physical mapping of herpes simplex virus induced polypeptides, *J. Virol.*, **28**, 624—642.
188. Marshall R. (1972). Glycoproteins, *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 673—702.
189. Martin W. B., Hay D., Crawford L. V., Lebovier G. L., Crawford E. M. (1966). Characteristics of bovine mammillitis virus, *J. Gen. Microbiol.*, **45**, 325—332.
190. Matthews R. E. F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, *Intervirology*, **17**, 1—199.
191. Matthews T. J., Cohen G. H., Eisenberg R. J. (1983). Synthesis and processing of glycoprotein D of herpes simplex virus type 1 and 2 in an in vitro system, *J. Virol.*, **48**, 521—533.
192. Mayo K. E., Warren R., Palmiter R. D. (1982). The mouse metallothionein-I gene is transcriptionally regulated following transfection into human or mouse cells, *Cell*, **29**, 99—108.
193. McClure H. M., Swenson R. B., Kalter S. S., Lester T. L. (1980). Natural genital herpesvirus hominis infection in chimpanzees (*Pan trogloditis* and *Pan iseus*), *Lab. Anim. Sci.*, **30**, 895—901.
194. McCombs R., Brunschwig J. P., Mirkovic R., Benyesh-Melnick M. (1971). Electron microscopic characterization of a herpes-like virus isolated from tree shrews, *Virology*, **45**, 816—820.
195. McKnight S. L. (1982). Functional relationship between transcriptiinal control signals of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus, *Cell*, **31**, 355—365.
196. McKnight S. L., Kingsbury R. (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene, *Science*, **217**, 316—324.
197. McKnight S. L., Gavis E. R., Kingsbury R., Alex R. (1981). Analysis transcriptional regulatory signals of the HSV thymidine kinase gene: Identification of an upstream control region, *Cell*, **25**, 385—398.
198. McLaughlan J., Clements J. B. (1982). A 3' co-terminus of two early herpes simplex virus type 1 mRNAs, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 501—512.
199. Melendez L. V., Daniel M. D., Hunt R. D., Garcia F. G. (1968). An apparently new herpesvirus from promary kidney cultures of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*), *Lab. Anim. Care*, **18**, 374—381.
200. Mocarski E. S., Roizman B. (1981). Site specific inversion sequence of herpes simplex virus genome: Domain and structural features, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7047—7051.

201. Mocarski E. S., Roizman B. (1982). Herpesvirus-dependent amplification and inversion of a cell-associated viral thymidine kinase gene flanked by viral  $\alpha$  sequences and linked to an origin of viral DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5626—5630.
202. Mocarski E. S., Roizman B. (1972). The structure and role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA, *Cell*, **31**, 89—97.
203. Mocarski E. S., Post L. E., Roizman B. (1980). Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: Insertion of a second L—S junction into the genome causes additional genome inversions, *Cell*, **22**, 243—255.
204. Morgan C., Rose H. M., Mednis B. (1968). Electron microscopy of herpes simplex virus. I. Entry, *J. Virol.*, **2**, 507—516.
205. Morgan C., Rose H. M., Holden M., Jones E. P. (1959). Electron microscopic observations on the development of herpes simplex virus, *J. Exp. Med.*, **110**, 643—656.
206. Morrison J. M., Keir H. M. (1968). A new DNA-exonuclease in cells infected with herpes virus: Partial purification and properties of the enzyme, *J. Gen. Virol.*, **3**, 337—374.
207. Morse L. S., Buchman T. G., Roizman B., Schaffer P. A. (1977). Anatomy of herpes simplex virus DNA. IX. Apparent exclusion of some parental DNA appangements in the generation of intertypic (HSV-1 $\times$ HSV-2) recombinants, *J. Virol.*, **24**, 231—248.
208. Morse L. S., Pereira L., Roizman B., Schaffer P. A. (1978). Anatomy of HSV DNA. XI. Mapping of viral genes by analysis of polypeptides and functions specified by HSV-1 $\times$ HSV-2 recombinants, *J. Virol.*, **26**, 389—410.
209. Moss H., Chartrand P., Timbury M. C., Hay J. (1979). Mutant of herpes simplex virus type 2 with temperature sensitive lesions affecting virion thermostability and DNase activity: Identification of the lethal mutation and physical mapping of the nuc<sup>-</sup> lesion, *J. Virol.*, **32**, 140—146.
210. Murchie M. J., McGeoch D. J. (1982). DNA sequence analysis of an immediate-early gene region of the herpes simplex virus type 1 genome (map coordinates 0.950—0.978), *J. Gen. Virol.*, **62**, 1—15.
211. Nazerian K. (1974). DNA configuration in the core of Marek's disease virus, *J. Virol.*, **13**, 1148—1150.
212. Nevins J. R. (1981). Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product, *Cell*, **26**, 213—220.
213. Nieman H., Klenk H. D. (1981). Coronavirus glycoprotein E1, a new type of viral glycoprotein, *J. Mol. Biol.*, **153**, 993—1010.
214. Nishioka Y., Silverstein S. (1977). Degradation of cellular mRNA during infection by herpes simplex virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2370—2374.
215. Nishioka Y., Silverstein S. (1978). Alterations in the protein synthesis apparatus of Friend erythroleukemia cells infected with vesicular stomatitis virus or herpes simplex virus, *J. Virol.*, **25**, 422—426.
216. Nishioka Y., Silverstein S. (1978). Requirement of protein synthesis for the degradation of host mRNA in Friend erythroleukemia cells infected with herpes simplex virus type 1, *J. Virol.*, **27**, 619—627.
217. Nonoyama M., Pagano J. S. (1972). Replication of viral deoxyribonucleic acid and breakdown of cellular deoxyribonucleic acid in Epstein-Barr virus infection, *J. Virol.*, **9**, 714—716.
218. Norrild B. (1980). Immunochemistry of HSV glycoproteins, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **90**, 67—106.
219. O'Callaghan D. J., Hyde J. M., Gentry G. A., Randall C. C. (1968). Kinetics of viral deoxyribonucleic acid, protein, and infectious particle production and alterations in host macromolecular syntheses in equine abortion (herpes) virus-infected cells, *J. Virol.*, **2**, 793—804.

220. Olofsson S., Blomberg J., Lycke E. (1981). O-glycosidic carbohydrate-peptide linkages of herpes simplex virus glycoprotein, *Arch. Virol.*, **70**, 321—329.
221. Para M., Baucke R., Spear P. G. (1980). IG-G (FG)-binding receptors on virions of HSV-1 and transfer of these receptors to the cell surface by infection, *J. Virol.*, **4**, 512—520.
222. Para M. F., Baucke R. B., Spear P. G. (1982). Glycoprotein gE of herpes simplex virus type 1: Effects of anti gE on virion infectivity and on virus-induced Fc-binding receptors, *J. Virol.*, **41**, 129—136.
223. Para M. F., Goldstein L., Spear P. G. (1982). Similarities and differences in the Fc-binding glycoprotein (gE) of herpes simplex viruses types 1 and 2 and tentative mapping of the viral gene for this glycoprotein, *J. Virol.*, **41**, 137—144.
224. Parris D. S., Dixon R. A. F., Schaffer P. A. (1980). Physical mapping of herpes simplex virus type 1 ts mutants by marker rescue: Correlation of the physical and genetic maps, *Virology*, **100**, 275—287.
225. Peake M. L., Nystrom P., Pizer L. I. (1982). Herpesvirus glycoprotein synthesis and insertion into plasma membranes, *J. Virol.*, **42**, 678—690.
226. Peden K., Mounts P., Hayward G. S. (1982). Homology between mammalian cell DNA sequences and human herpesvirus genomes detected by a hybridization procedure with high-complexity probe, *Cell*, **31**, 71—80.
227. Perdue M. L., Kemp M. C., Randall C. C., O'Callaghan D. J. (1974). Studies on the molecular anatomy of the L—M strain of equine herpes virus type 1: Proteins of the nucleocapsid and intact virion, *Virology*, **59**, 201—216.
228. Pereira L., Dondero D., Roizman B. (1982). Herpes simplex virus glycoprotein gA/B: evidence that the infected Vero cell products comap and arise by proteolysis, *J. Virol.*, **44**, 88—97.
229. Pereira L., Dondero D., Norrild B., Roizman B. (1981). Differential immunologic reactivity and processing of glycoproteins gA and gB of herpes simplex virus type 1 and 2 made in Vero and HEP-2 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5202—5206.
230. Pereira L., Wolff M., Fenwick M., Roizman B. (1977). Regulation of herpesvirus synthesis. V. Properties of  $\alpha$  polypeptides specified by HSV-1 and HSV-2, *Virology*, **77**, 733—749.
231. Person S., Kousoulas K. C., Knowles R. W., Read G. S., Holland T. C., Ketter P. M., Warner S. C. (1982). Glycoprotein processing in mutants of HSV-1 that induce cell fusion, *Virology*, **117**, 293—306.
232. Pizer L. I., Cohen G. H., Eisenberg R. J. (1980). Effect of tunicamycin on herpes simplex virus glycoproteins and infectious virus production, *J. Virol.*, **34**, 142—153.
233. Plummer G., Goodheart C. R., Studdert M. J. (1973). Equine herpesviruses: Antigenic relationship and DNA densities, *Infect. Immun.*, **8**, 621—627.
234. Plummer G., Goodheart C. R., Henson D., Bowling C. P. (1969). A comparative study of the DNA density and behavior in tissue cultures of fourteen different herpesviruses, *Virology*, **39**, 134—137.
235. Poffenberger K. L., Tabares E., Roizman B. (1983). Characterization of a viable, non-inverting herpes simplex virus 1 genome derived by insertion of sequences at the L—S component junction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2690—2694.
236. Ponce de Leon M., Eisenberg R. J., Cohen G. H. (1977). Ribonucleotide reductase from herpes simplex virus (types 1 and 2) infected and uninfected KB cells: Properties of the partially purified enzymes, *J. Gen. Virol.*, **36**, 163—173.
237. Post L. E., Roizman B. (1981). A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes:  $\alpha$  gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth, *Cell*, **25**, 227—232.



238. Post L. E., Mackem S., Roizman B. (1981). The regulation of  $\alpha$  genes of herpes simplex virus: Expression of chimeric genes produced by fusion of thymidine kinase with  $\alpha$  gene promoters, *Cell*, **24**, 555—565.
239. Powell K., Purifoy D. (1977). Nonstructural proteins of herpes simplex virus. I. Purification of the induced DNA polymerase, *J. Virol.*, **24**, 618—626.
240. Preston C. M. (1977). Cell-free synthesis of herpes-simplex virus coded pyrimidine deoxyribonucleotide kinase enzyme, *J. Virol.*, **23**, 455—460.
241. Preston C. M. (1979). Control of herpes simplex virus type 1 mRNA synthesis in cells infected with wild-type virus or the temperature-sensitive mutant tsK, *J. Virol.*, **29**, 275—284.
242. Preston C. M., Cordingley M. G. (1982). mRNA- and DNA-directed synthesis of herpes simplex virus-coded exonuclease in *Xenopus laevis* oocytes, *J. Virol.*, **43**, 386—394.
243. Preston C. M., McGeoch D. J. (1981). Identification and mapping of two polypeptides encoded within the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene, *J. Virol.*, **38**, 593—605.
244. Preston C. M., Notarianni E. L. (1983). Poly (ADP-ribosyl)ation of a herpes simplex virus immediate early polypeptide, *Virology*, **131**, 492—501.
245. Preston V. G. (1981). Fine structure mapping of herpes simplex virus type 1 temperature-sensitive mutations within the short repeat region of the genome, *J. Virol.*, **39**, 150—161.
246. Preston V. G., Davison A. J., Marsden H. S., Timbury M. C., Subak-Sharpe J. H., Wilkie N. M. (1978). Recombinants between herpes simplex virus type 1 and 2: Analyses of genome structures and expression of immediate-early polypeptides, *J. Virol.*, **28**, 499—517.
247. Puga A., Cantin E. M., Notkins A. L. (1982). Homology between murine and human cellular DNA sequences and the terminal repetition of the S component of herpes simplex type 1 DNA, *Cell*, **31**, 81—87.
248. Purifoy D. J. M., Powell K. L. (1976). DNA-binding proteins induced by herpes simplex virus type 2 in HEp-2 cells, *J. Virol.*, **19**, 717—731.
249. Purifoy D. J. M., Powell K. L. (1977). Herpes simplex virus DNA polymerase as the site of phosphonoacetate sensitivity: Temperature sensitive mutants, *J. Virol.*, **24**, 470—477.
250. Purifoy D. J. M., Powell K. L. (1981). Temperature-sensitive mutants in two distinct complementation groups of herpes simplex virus type 1 specify thermolabile DNA polymerase, *J. Gen. Virol.*, **54**, 219—222.
251. Rand T. H., Ben-Porat T. (1980). Distribution of sequences homologous to the DNA of herpes simplex virus type 1 and 2, in the genome of pseudorabies virus, *Intervirology*, **13**, 48—53.
252. Randall C. C., Ryden F. W., Doll E. R., Shell F. S. (1953). Cultivation of equine abortion virus in fetal horse tissue in vitro, *Am. J. Pathol.*, **29**, 139—153.
253. Read G. S., Frenkel N. (1983). Herpes simplex virus mutants defective in the virion associated shut-off of host polypeptide synthesis and exhibiting abnormal synthesis of  $\alpha$  (immediate early) viral polypeptides, *J. Virol.*, **46**, 498—512.
254. Rixon F. J., Clements J. B. (1982). Detailed structural analysis of two spliced HSV-1 immediate-early mRNAs, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2241—2256.
255. Roizman B. (1962). Polykaryocytosis induced by viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 228—234.
256. Roizman B. (1963). The programming of herpesvirus multiplication in mammalian cells. In: *Viruses, Nucleic Acids and Cancer*, pp. 205—223, William and Wilkins Co., Baltimore, Md.
257. Roizman B. (1973). Herpesviruses. In: *The Molecular Biology of Tumor Viruses*, ed. by J. Tooze, pp. 470—501, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

258. Roizman B. (1979). The organization of the herpes simplex virus genomes, *Annu. Rev. Genet.*, **13**, 25—57.
259. Roizman B. (1979). The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes, *Cell*, **16**, 481—494.
260. Roizman B. (1982). The family Herpesviridae. General description taxonomy and classification. In: *The Viruses*, Vol. I; Herpesviruses, ed. by B. Roizman, pp. 1—23, Plenum Press, New York.
261. Roizman B., Buchman T. G. (1979). The molecular epidemiology of herpes simplex viruses, *Hosp. Pract.*, **14**, 95—104.
262. Roizman B., Furlong D. (1974). The replication of herpesviruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 3, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 229—403, Plenum Press, New York.
263. Roizman B., Roane P. R., Jr. (1964). Multiplication of herpes simplex virus. II. The relation between protein synthesis and the duplication of viral DNA in infected HEp-2 cells, *Virology*, **22**, 262—269.
264. Roizman B., Tognon M. (1982). Restriction enzyme analysis of herpesvirus DNA: Stability of restriction endonuclease patterns, *Lancet*, **1**, 677.
265. Roizman B., Borman G. S., Kamali-Rousta M. (1965). Macromolecular synthesis in cells infected with herpes simplex virus, **206**, 1374—1375.
266. Roizman B., Norrild B., Chan C., Pereira L. (1984). Identification of a herpes simplex virus 2 glycoprotein lacking a known type 1 counterpart, *Virology*, **133**, 242—247.
267. Roizman B., Carmichael L. E., Deinhardt F., de The G., Nahmias A. J., Plowright W., Rapp F., Sheldrick P., Takahashi M., Wolf K. (1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy, *Intervirology*, **16**, 201—217.
268. Rubenstein D. S., Gravell M., Darlington R. (1972). Protein kinase in enveloped herpes simplex vions, *Virology*, **50**, 287.
269. Ruyechan W. I. (1973). The major herpes simplex virus DNA-binding protein holds single-stranded DNA in an extended conformation, *J. Virol.*, **46**, 661—666.
270. Ruyechan W. T., Morse L. S., Knipe D. M., Roizman B. (1979). Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behaviour of infected cells, *J. Virol.*, **29**, 677—697.
271. Rymo L., Forsblum S. (1978). Cleavage of Epstein-Barr virus DNA by restriction endonuclease EcoRI, HindIII, and Bam I, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1387.
272. Sandri-Goldin A. L., Goldin A. L., Holland L. E., Glorioso J. C., Levine M. (1983). Expression of herpes simplex virus  $\beta$  and  $\gamma$  genes integrated in mammalian cells and their induction by an  $\alpha$  gene product, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2028—2044.
273. Sarmiento M., Haffey M., Spear P. G. (1979). Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. III. Role of glycoprotein VP7(B<sub>2</sub>) in virion infectivity, *J. Virol.*, **29**, 1149—1158.
274. Schneweis K. E. (1962). Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des herpesvirus hominis, *Z. Immunitaetsforsch. Exp. Ther.*, **124**, 24—48.
275. Schroder C. H., Stegmann B., Lauppe H. F., Kaerner H. C. (1975/1976). A universal defective genotype derived from herpes simplex virus strain ANG, *Intervirology*, **6**, 270—284.
276. Schulte-Holthausen H., Hausen H. (1970). Purification of the Epstein-Barr virus and some properties of its DNA, *Virology*, **40**, 776—779.
277. Schwartz J., Roizman B. (1969). Similarities and differences in the development of laboratory strains and freshly isolated strains of herpes simplex viruses in HEp-2 cells: Electron microscopy, *J. Virol.*, **4**, 879—889.

278. Scott T. F., Burgoon C. F., Coriell I. L., Blank M. (1953). The growth curve of the virus of herpes simplex in rabbit corneal cells grown in tissue culture with parallel observations on the development of the intranuclear inclusion body, *J. Immunol.*, **71**, 385—396.
279. Serafini-Cessi F., Scannavini M., Campadelli-Fiume G. (1983). Processing of herpes simplex virus 1 glycans in cells defective in glycosyl transferase of the Golgi system: Relationship to cell fusion and virion egress, *Virology*, **131**, 59—70.
280. Sharp J. A., Wagner M. J., Summers W. C. (1983). Transcription of herpes simplex virus gene in vivo: Overlap of a late promoter with the 3' end of the early thymidine kinase gene, *J. Virol.*, **45**, 10—17.
281. Sheldrick P., Berthelot N. (1975). Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 667.
282. Sheldrick P., Laithier M., Larria D., Ryhinder M. L. (1973). Infectious DNA from herpes simplex virus: Infectivity of double- and single-stranded molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3621—3625.
283. Shida H., Dales S. (1981). Biogenesis of vaccinia: Carbohydrate of the hemagglutinin molecule, *Virology*, **111**, 56—76.
284. Silverstein S., Engelhardt E. L. (1979). Alterations in the protein synthetic apparatus of cells infected with herpes simplex virus, *Virology*, **95**, 324—342.
285. Silverstein S., Bachenheimer S. L., Frenkel N., Roizman B. (1973). Relationship between post-transcriptional adenylation of herpes virus RNA and messenger RNA abundance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2101—2105.
286. Silverstein S., Millette R., Jones P., Roizman B. (1976). RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. XII. Sequence complexity and properties of RNA differing in extent of adenylation, *J. Virol.*, **18**, 977—991.
287. Smiley J., Fong B., Leung W. C. (1981). Construction of a double jointed herpes simplex virus DNA molecule: Inverted repeats are required for segment inversion and direct repeat promote deletions, *Virology*, **111**, 345—362.
288. Smith M. G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease (22498), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **92**, 424—430.
289. Spaete R. R., Frenkel N. (1982). The herpes simplex virus amplicon: A new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector, *Cell*, **30**, 295—304.
290. Spear P. G. (1976). Membrane proteins specified by herpes simplex virus. I. Identification of four glycoprotein precursors and their products in type 1-infected cells, *J. Virol.*, **17**, 991—1008.
291. Spear P. G. (1984). Glycoproteins specified by herpes simplex viruses. In: *The Herpesviruses*, Vol. 3, ed. by B. Roizman, Plenum Press, New York.
292. Spear P. G., Roizman B. (1968). The protein specified by herpes simplex viruses. I. Time of synthesis, transfer into nuclei and proteins made in productively infected cells, *Virology*, **36**, 545—555.
293. Spear P. G., Roizman B. (1972). Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion, *J. Virol.*, **9**, 431—439.
294. Spear P. G., Roizman B. (1980). Herpes simplex viruses. In: *DNA Tumor Viruses*, ed. by J. Tooze, pp. 615—745, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
295. Spear P. G., Keller J. M., Roizman B. (1970). The proteins specified by herpes simplex virus. II. Viral glycoproteins associated with cellular membranes, *J. Virol.*, **5**, 123—131.
296. Spiro R. G., Spiro M. J. (1982). Studies on the synthesis and processing of the asparagine-linked carbohydrate units of glycoproteins, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.]*, **300**, 117—127.



297. *Spring S. B., Roizman B.* (1968). Herpes simplex virus products in productive and abortive infection. III. Differentiation of infectious virus derived from nucleus and cytoplasm with respect to stability and size, *J. Virol.*, **2**, 979—985.
298. *Stackpole C. W.* (1969). Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature, *J. Virol.*, **4**, 75—93.
299. *Sterz H., Ludwig H., Rott R.* (1974). Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine herpes mammillitis virus, *Intervirology*, **2**, 1—13.
300. *Stinski M.* (1983). Molecular biology of cytomegaloviruses. In: *The Herpesviruses*, Vol. 2, ed. by B. Roizman, Plenum Press, New York.
301. *Stow N. D.* (1982). Localization of an origin of DNA replication within the TR<sub>s</sub>/IR<sub>s</sub> repeated region of the herpes simplex virus type 1 genome, *EMBO J.*, **1**, 863—867.
302. *Stow N. D., McMonagle E. C.* (1983). Characterization of the TR<sub>s</sub>/IR<sub>s</sub> origin of DNA replication of herpes simplex virus type 1, *Virology*, **130**, 427—438.
303. *Stringer J., Holland J. L., Swanstrom R., Pivo K., Wagner E.* (1977). Quantitation of herpes simplex virus type 1 RNA in infected HeLa cells, *J. Virol.*, **21**, 889—901.
304. *Strnad B. C., Aurelia L.* (1976). Proteins of herpesvirus type 2. I. Virion, nonvirion and antigenic polypeptides in infected cells, *Virology*, **69**, 438—452.
305. *Summers W. P., Wagner M., Summers W. C.* (1975). Possible peptide chain termination mutants in thymidine kinase gene of a mammalian virus, herpes simplex virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4081—4084.
306. *Sydskis R. J., Roizman B.* (1966). The disaggregation of host polyribosomes in productive and abortive infection with herpes simplex virus, *Virology*, **32**, 678—686.
307. *Sydskis R. J., Roizman B.* (1966). Polysomes and protein synthesis in cells infected with a DNA virus, *Science*, **153**, 76—78.
308. *Sydskis R. J., Roizman B.* (1968). The sedimentation profiles of cytoplasmic polyribosomes in mammalian cells productively and abortively infected with herpes simplex virus, *Virology*, **34**, 562—565.
309. *Tabas I., Schlesinger S., Kornfeld S.* (1978). Processing of high mannose oligosaccharides to form complex type oligosaccharides on the newly synthesized polypeptides of the vesicular stomatitis virus G protein and IgG heavy chain, *J. Biol. Chem.*, **253**, 716—722.
310. *Tenser R. B., Dunstan M. E.* (1979). Herpes simplex virus thymidine kinase expression in infection of the trigeminal ganglion, *Virology*, **99**, 417—422.
311. *Tognon M., Cassai E., Rotola A., Roizman B.* (1983). The heterogeneous regions in herpes simplex virus 1 DNA, *Microbiologica*, **6**, 191—198.
312. *Tognon M., Manservigi R., Cavrini V., Campadelli-Fiume G.* (1984). Characterization of a herpes simplex type 1 mutant resistant to benzhydrazone, a selective inhibitor of herpesvirus glycosylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2440—2443.
313. *Vlazny D. A., Frenkel N.* (1981). Replication of herpes simplex virus DNA: Location of replication recognition signals within defective virus genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 742—746.
314. *Vlazny D. A., Kwong A., Frenkel N.* (1982). Site specific cleavage packaging of herpes simplex virus DNA and the selective maturation of nucleocapsids containing full length viral DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1423—1427.
315. *Wadsworth S., Jacob R. J., Roizman B.* (1975). Anatomy of herpes simplex

- virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions, *J. Virol.*, **15**, 1487—1497.
316. *Wagner E. K.* (1984). Individual HSV transcripts: Characterization of specific genes. In: *Herpesviruses*, Vol. 3, ed. by B. Roizman, Plenum Press, New York.
  317. *Wagner E. K., Roizman B.* (1969). RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. I. The patterns of RNA synthesis in productively infected cells, *J. Virol.*, **4**, 36—46.
  318. *Wagner M. J., Sharp J. A., Summers W. C.* (1981). Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1441—1445.
  319. *Wagner M. M., Summers W. C.* (1978). Structure of the joint region and the termini of the DNA of herpes simplex virus type 1, *J. Virol.*, **27**, 374—387.
  320. *Watson R. J., Vande Woude G. F.* (1982). DNA sequence of an immediate-early gene (IE mRNA-5) of herpes simplex virus 1, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 979—991.
  321. *Watson R. J., Preston C. M., Clements B.* (1979). Separation and characterization of herpes simplex virus type 1 immediate-early mRNA's, *J. Virol.*, **31**, 42—52.
  322. *Watson R. J., Sullivan M., Vande Woude G. F.* (1981). Structure of two spliced herpes simplex virus type 1 immediate-early mRNA's which map at the junctions of the unique and reiterated regions of the virus DNA S component, *J. Virol.*, **37**, 431—444.
  323. *Watson R. J., Weis J. H., Salstrom J. S., Enquist L. W.* (1982). Herpes simplex virus type 1 glycoprotein D gene: Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*, *Science*, **218**, 381—383.
  324. *Weller S. K., Aschman D. P., Sacks W. R., Coen D. M., Schaffer P. A.* (1983). Genetic analysis of temperature sensitive mutants of HSV-1: The combined use of complementation and physical mapping for cistron assignment, *Virology*, **130**, 290—305.
  325. *Weller T. H.* (1953). Serial propagation in vitro of agents producing inclusion bodies derived from varicella and herpes zoster, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**, 340—346.
  326. *Wells A., Koide N., Klein G.* (1981). Difference in viral binding between two Epstein-Barr virus substrains to a spectrum of receptor-positive target cells, *Int. J. Cancer*, **27**, 303—309.
  327. *Wigler M., Silverstein S., Lee L.-S., Pellicer A., Cheng Y.-C., Axel R.* (1977). Transfer of purified herpesvirus thymidine kinase gene to cultured mouse cells, *Cell*, **11**, 223—232.
  328. *Wilcox K. W., Kohn A., Sklyanskaya E., Roizman B.* (1980). Herpes simplex virus phosphoprotein. I. Phosphate cycles on and off some viral polypeptides and can alter their affinity for DNA, *J. Virol.*, **33**, 167—182.
  329. *Wildy P., Watson D. H.* (1963). Electron microscopic studies on the architecture of animal viruses, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 25—47.
  330. *Wildy P., Russell W. C., Horne R. W.* (1960). The morphology of herpesvirus, *Virology*, **12**, 204—222.
  331. *Wilkie N. M.* (1973). The synthesis and substructure of herpesvirus DNA: The distribution of alkali labile single strand interruptions in HSV-1 DNA, *J. Gen. Virol.*, **21**, 453—467.
  332. *Wolf K., Darlington R. W.* (1971). Channel catfish virus: A new herpesvirus of ictalurid fish, *J. Virol.*, **8**, 525—533.
  333. *Wolf H., Roizman B.* (1978). The regulation of  $\gamma$  (structural) polypeptide synthesis in herpes simplex virus types 1 and 2 infected cells. In: *Oncogenesis and Herpesviruses*, Vol. 3, ed. by G. de The et al., p. 327, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

334. Yasuda J., Milgrom F. (1968). Hemadsorption by herpes simplex-infected cell culture, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 33, 151.
335. Zemla J., Coto C., Kaplan A. S. (1967). Correlation between loss of enzymatic activity and of protein from cells infected with pseudorabies virus, *Virology*, 31, 736—738.
336. Zezulak K. M., Spear P. G. (1983). Characterization of a herpes simplex virus type 2 (HSV-2) 75,000 molecular weight glycoprotein antigenically related to HSV-1 glycoprotein C, *J. Virol.*, 47, 553—562.
337. Zezulak K. M., Spear P. G. (1984). Mapping of the structural gene for the herpes simplex virus type 2 counterpart of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C and identification of a type 2 mutant which does not express this protein, *J. Virol.*, 49, 741—747.
338. Zipser D., Lipsich L., Kwoh J. (1981). Mapping functional domains in the promoter region of the herpes thymidine kinase gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6276—6280.



## Репликация поксвирусов

*Бернард Мосс<sup>1</sup>*

Поксвирусы образуют большое семейство вирусов, поражающих как позвоночных, так и беспозвоночных. Для них характерны крупные размеры и сложная морфология, а также то, что их репликация происходит в цитоплазме. Наиболее известный представитель этого семейства является возбудителем натуральной оспы у человека. Как уже указывал Феннер в гл. 18, эта болезнь была в конце концов полностью искоренена благодаря предохранительным прививкам вируса осповакцины, которые начали применять еще с конца XVIII в. Вакцинация давно вошла в общую практику и внесла несомненный вклад в современные представления об инфекционных болезнях и механизме иммунологической защиты. Сам термин «вакцинация» вошел в общее употребление, обозначая иммунизацию против инфекционных агентов. Вирус осповакцины был первым вирусом позвоночных, который удалось увидеть в микроскоп, тщательно «оттитровать», физически очистить и подвергнуть химическому анализу. В последние годы работы по исследованию поксвирусов внесли исключительно важный вклад в наши знания о стратегии, используемой вирусами для репликации и экспрессии своего генома. Некоторые свойства поксвирусов, в частности цитоплазматическая локализация синтеза вирусных РНК и ДНК, а также присутствие ферментов, участвующих в этих процессах, в составе вирусной частицы продолжают эффективно использоваться для выяснения механизмов основных биохимических процессов.

### Классификация

Классификация вирусов сем. Poxviridae, предложенная Международным комитетом по таксономии вирусов [117], представлена в табл. 30.1. Вирусы позвоночных и беспозвоночных выделены в два подсемейства. Все вирусы позвоночных содержат группоспецифический NP-антиген [219, 238] и обладают способностью к «спасению» других инактивированных прогреванием

<sup>1</sup> Bernard Moss, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20205.

Таблица 30.1. Семейство Poxviridae

Подсемейство	Род	Представители	Характерные признаки
<b>Chordopoxviridae</b> (поксвирусы позвоночных)	<i>Orthopoxvirus</i>	Вирусы оспы буйволов, оспы верблюдов, коровьей оспы, экстромелии, оспы обезьян, осповакцины <sup>1</sup> , натуральной оспы	Возбудитель натуральной оспы: ДНК 120·10 <sup>6</sup>
	<i>Parapoxvirus</i>	Вирусы пустулезного стоматита крупного рогатого скота, контагиозной эктимы серны, узелков доильщиц, орф <sup>1</sup>	Вирусы копытных: поверхностные трубчатые структуры образуют правильную спираль, ДНК 85·10 <sup>6</sup>
	<i>Avipoxvirus</i>	Вирусы оспы канарейки, оспы кур <sup>1</sup> , оспы Юнко, оспы голубей, оспы перепелов, оспы воробьев	Вирусы птиц: передаются членистоногими, ДНК 200·10 <sup>6</sup>
	<i>Capripoxvirus</i>	Вирусы оспы коз, бугорчатости кожи, оспы овец <sup>1</sup>	Вирусы копытных: вирионы длиннее и уже, чем у вируса осповакцины, передаются членистоногими
	<i>Leporipoxvirus</i>	Вirus миксомы <sup>1</sup> , фибромы кроликов, фибромы белок	Вирусы зайцев и белок: передаются членистоногими, ДНК 150·10 <sup>6</sup>
	<i>Suipoxvirus</i>	Вirus оспы свиней	Вirus свиней: ограниченный спектр хозяев
	Неклассифицированные	Вirus контагиозного моллюска, вирус Тана, обезьяний опухолевый вирус Яба	Вызывает доброкачественные опухоли у приматов. Virus контагиозного моллюска не размножается в тканевых культурах
<b>Entomopoxviridae</b> (вирусы оспы насекомых)	A	Вirus <i>Melontha melontha</i>	Родственные вирусы выделены из жесткокрылых (жуков): одно боковое тело, ДНК 200·10 <sup>6</sup>
	B	Вirus <i>Amsacta moori</i>	Родственные вирусы выделены из других чешуекрылых: боковые тела неразличимы, ДНК 140·10 <sup>6</sup>
	C	Вirus <i>Chironomus luridus</i>	Родственные вирусы выделены из других двукрылых: два боковых тела

<sup>1</sup> Прототип.

поксвирусов в процессе так называемой *негенетической реакции* [68, 79]. Если не считать нескольких неклассифицированных вирусов, вирусы позвоночных распределены по шести родам. Представители одного рода, как правило, близки по антигенным свойствам, имеют сходную морфологию и специфичность в отношении хозяина. Степень сходства между индивидуальными ортопоксвирусами выявлена иммунологическими методами [15, 57], путем анализа полипептидов [5, 81], методом гибридизации нуклеиновых кислот [19], а также с помощью эндонуклеаз рестрикции [58, 112, 237].

Подробные сведения о репликации получены только для ортопоксвирусов, преимущественно для вируса осповакцины. Поэтому в данной главе о представителях других родов говорится относительно мало. Дополнительную информацию о других поксвирусах можно найти в гл. 18 и работах [1, 21].

## Структура вириона

### Морфология

Поксвирусы — наиболее крупные из всех вирусов животных. Их можно увидеть в световой микроскоп — правда, без каких-либо деталей их строения — если использовать препарат, обработанный серебром. При более сильном увеличении, которое дает электронный микроскоп, вирионы выглядят как тельца овальной или прямоугольной формы, примерно 200—400 нм в длину, с отношением осей 1,2—1,7. В отличие от других ДНК-содержащих вирусов поксвирусы не обладают икосаэдрической симметрией и имеют довольно сложную структуру [50]. На внешней поверхности вируса видны бороздки, иногда образующие параллельные ряды; у парапоксвирусов они образуют единую непрерывную спираль. При изучении ультратонких срезов вирусов обнаруживается липопротеиновый бислой (его называют внешней мембраной или оболочкой), окружающий плотную центральную часть вирусной частицы — сердцевину, или нуклеонид. У вирусов позвоночных нуклеонид имеет двояковогнутую форму; в местах вогнутостей можно различить два так называемых *боковых тела*, функция которых неизвестна (рис. 30.1). У поксвирусов насекомых нуклеонид может иметь почкообразную форму с вогнутостью только с одной стороны и боковым телом в ней или прямоугольную с расположенным вокруг него материалом промежуточной плотности. Более детальный анализ показывает, что вещество нуклеоида образовано скрученной и компактно уложенной нуклеопротеиновой нитью [228]. Его фиксация позволила выявить глобулярные электроплотные структуры, соединенные нитями ДНК [208].



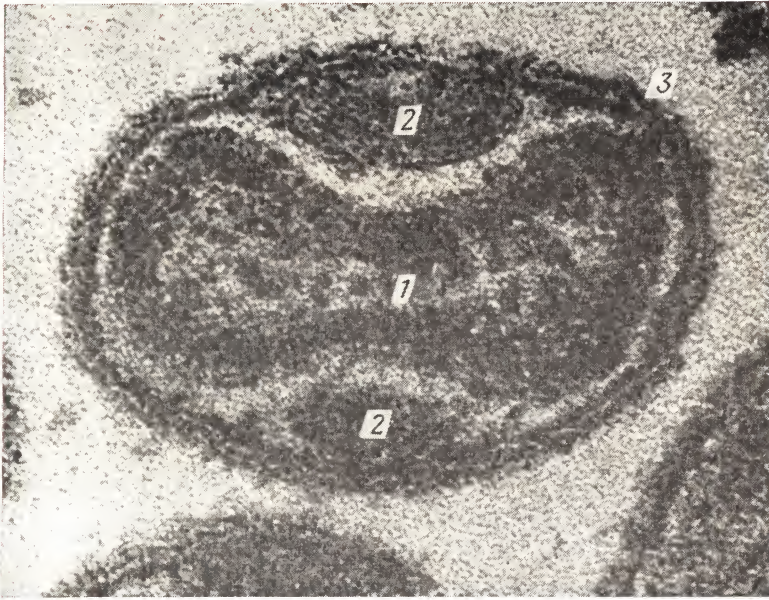


Рис. 30.1. Электронная микрофотография тонкого среза клетки, содержащей частицу вируса осповакцины. 1 — нуклеоид, 2 — боковые тела, 3 — наружная мембрана (оболочка). (Из [178], с разрешения авторов.)

Здесь и при последующем изложении, если специально не оговаривается, речь идет о вирусных частицах, выделенных из зараженных клеток. Во внеклеточных частицах вируса осповакцины, выделенных со всеми возможными предосторожностями, обнаружена дополнительная липопротеиновая оболочка, отсутствующая на рис. 30.1.

#### Химический состав

Крупные размеры поксвирусов облегчают их выделение, которое можно вести путем центрифугирования при относительно малых скоростях. Поэтому их удалось выделить раньше, чем другие вирусы животных. Это позволило уже на ранних этапах исследования достаточно точно определить их химический состав [203]. Главными компонентами вируса осповакцины являются белки, липиды и ДНК. Они составляют соответственно 90, 5 и 3,2% общего сухого веса [240], который можно оценить в  $5 \cdot 10^{-15}$  г [204]. Вместе с тем у вируса оспы кур липиды составляют около одной трети сухого веса [111]. Липидные компоненты вируса осповакцины представлены преимущественно холестерином и фосфолипи-

дами [212], тогда как вирус оспы кур содержит еще сквален и эфиры холестерина [111]. В составе вируса осповакцины обнаружены спермин, спермидин [109] и следовые количества РНК [184], но их значение не установлено.

### Полипептиды

Поскольку белковая оболочка, предохраняющая лабильные нуклеиновые кислоты и ферменты от губительного для них внешнего окружения, нерастворима, исследование входящих в ее состав полипептидов в нативном состоянии затруднительно. Полная солюбилизация поксвирусов может быть достигнута лишь нагреванием до 100 °С в присутствии сильных ионных детергентов, например додецилсульфата натрия, и восстанавливающих агентов. При разделении диссоциированных в додецилсульфате полипептидов с помощью одномерного электрофореза в полиакриламидном геле обычно выявляют до 30 полос [193], однако с переходом к двумерному электрофорезу обнаруживают более 100 полипептидов [60, 150]. Получаемые таким образом полипептидные карты могут быть использованы для идентификации поксвирусов, принадлежащих к разным родам, и даже для идентификации индивидуальных вирусов в пределах одного рода [5].

Полипептиды вируса осповакцины имеют молекулярные массы от 8К до 200К. Среди них есть по крайней мере один гликопротеин с мол. массой 40К и один фосфопротеин с мол. массой 11К [193]. Гликопротеин необычен в том отношении, что содержит сахар всего одного типа — N-ацетилглюкозамин [72]. При анализе фосфопротеина в составе триптического гидролизата найден только один фосфопептид, содержащий фосфосерин [185]. Фосфопротеин интересен тем, что он содержится в большом количестве и обладает высоким сродством к сверхспиральному дуплексу и одноцепочечной ДНК [93].

Несколько полипептидов вируса осповакцины обнаружили вблизи поверхности вирусной частицы с помощью ряда методов — адсорбции поверхностно-специфичных меток, протеолиза, обработки неионными детергентами [193]. Один из обнаруженных таким образом белков с мол. массой 58К образует на поверхности трубчатые структуры, способные связывать антитела, нейтрализующие инфекционность и препятствующие слиянию клеток [213]. После удаления внешней мембраны неионными детергентами нуклеоид можно разрушить; при этом вещество нуклеоида распределяется между фракцией растворимых ферментов и фракцией нерастворимых структурных белков [161]. По крайней мере четыре белка прочно связаны с ДНК и, по-видимому, поддерживают ее в компактно свернутом, сверхспиральном состоянии

[208]. Каких-либо структур, сходных с нуклеосомами эукариотических хромосом, не обнаружено. Еще восемь полипептидов, из которых семь — в том числе гемагглютинин — гликозилированы, входят в состав оболочки внеклеточной формы вируса осповакцины [162, 163]. Гемагглютинин идентифицирован как 85К-белок, содержащий как N-, так и O-связанные олигосахаридные цепи [197].

### Ферменты

Инфекционные частицы поксвирусов содержат систему транскрипции [96, 144], способную синтезировать функциональную мРНК в полиаденилированной [94], кэпированной и метилированной форме [230]. В эту систему входит много ферментов, присутствующих в составе вирусной частицы. Хотя соответствующих генетических данных пока еще нет, само поведение этих ферментов показывает, что кодирующие их гены входят в состав весьма крупного вирусного генома. В табл. 30.2 приведен список ферментов, упакованных в вирусный нуклеоид, и их основные свойства. Некоторые из ферментов, очевидно, участвуют в процессах транскрипции и модификации мРНК, но биологическая роль большинства других ферментов неизвестна.

Ключевой фермент, РНК-полимераза, имеет мол. массу ~ 500К и, подобно эукариотическим РНК-полимеразам, состоит из двух больших субъединиц с мол. массой более 100К и нескольких субъединиц меньших размеров. От эукариотической РНК-полимеразы II вирусный фермент можно отличить по характерной для него устойчивости к токсину  $\alpha$ -аманитину, по ингибирующему действию специфичных к нему антител (Е. V. Jones, В. Moss, неопубликованные данные) и по результатам детального анализа полипептидов [148]. Очищенная вирусная РНК-полимераза не способна к транскрипции двухцепочечной ДНК, что свидетельствует об участии в процессе транскрипции еще каких-то вирусных белков.

Кэпирование и метилирование образующейся РНК осуществляется ферментным комплексом с мол. массой 127К, который состоит из двух субъединиц, наделенных активностями нескольких видов. Комплекс удаляет концевой  $\gamma$ -фосфат в цепи РНК и взаимодействует с GTP с образованием промежуточного GMP-содержащего ковалентного производного; вслед за тем он переносит GMP на дифосфатный конец РНК и стабилизирует конечный продукт путем переноса метильной группы с S-аденозилметионина (Ado Met) в седьмое положение присоединяемого гуанозина. Далее отдельный фермент, РНК- (нуклеозид-2'-) метилтрансфераза, катализирует метилирование остатка рибозы соседнего нуклеотида. Каждая из этих стадий может протекать до завершения



Таблица 30.2. Ферменты, выделенные из вируса осповакцины

**РНК-полимераза** [10, 210]

Мол. масса 500К (140К, 137К, 37К, 35К, 31К, 22К, 17К)

Требуется одноцепочечную ДНК-матрицу, присутствия ионов  $\text{Mn}^{2+}$ , предполагается участие в процессе транскрипции**Poly(A)-полимераза** [134]

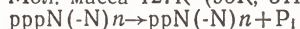
Мол. масса 80К (55К, 30К)



Зависит от присутствия затравки, специфична к АТР, предполагается участие в процессе полиаденилирования мРНК

**РНК-трифосфатаза** [222, 226]

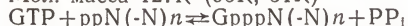
Мол. масса 127К (95К, 31К)



Образует единый комплекс с РНК-гуанилтрансферазой и РНК(гуанин-7-)метилтрансферазой, участвует в копировании мРНК

**РНК-гуанилтрансфераза** [114—116, 199, 200]

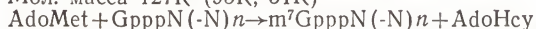
Мол. масса 127К (95К, 31К)



Образует единый комплекс с РНК-трифосфатазой и РНК(гуанин-7-)метилтрансферазой, 95К-полипептид образует ковалентный GMP-комплекс, участвует в копировании

**РНК(гуанин-7-)метилтрансфераза** [114, 115]

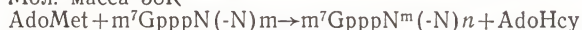
Мол. масса 127К (95К, 31К)



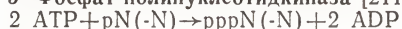
Образует единый комплекс с РНК-трифосфатазой и РНК-гуанилтрансферазой

**РНК(нуклеозид-2'-)метилтрансфераза** [9b, 9c]

Мол. масса 38К



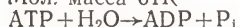
Метилирование кэпа

**5'-Фосфат-полинуклеотидкиназа** [211]

Частично охарактеризован, предполагается участие в процессинге РНК

**Аденозинтрифосфатаза** [76, 159, 161]

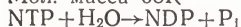
Мол. масса 61К



Специфична к АТР и dATP, ДНК-зависимый фермент

**Нуклеозидтрифосфатаза** [159, 161]

Мол. масса 68К



Субстратами служат рибо- или дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, фермент стимулируется в присутствии ДНК или РНК и имеет антигенные отличия от АТР-азы

**Эндорибонуклеаза** [157]

Слабо охарактеризована, предполагается участие в процессинге РНК

**Дезоксирибонуклеаза (рН-оптимум 4,4)** [178, 179, 186, 187]

Мол. масса 105К (50К)



Специфична к одноцепочечной ДНК, является экзо- и эндонуклеазой

**Дезоксирибонуклеаза (рН-оптимум 7,8)** [178, 179]

Мол. масса 50К

ДНК + H<sub>2</sub>O → Олигодезоксирибонуклеотиды  
 Специфична к одноцепочечной ДНК, эндонуклеаза

**ДНК-топоизомераза [14]**

Мол. масса 44К

Тип I, приводит к релаксации ДНК как с правой, так и с левой сверхспирализацией

**Протеинкиназа [103, 104]**

Мол. масса 62К

АТР + Белок → Р-Белок + АДФ

Фосфорилирует остатки серина и треонина в вирусном белке, активируется протамином

**Щелочная протеаза [6]**

Белок + H<sub>2</sub>O → Пептиды

Обнаружена, но не выделена и не охарактеризована

синтеза цепи РНК. Накоплено множество данных, согласно которым для связывания мРНК с рибосомами необходимо присутствие 7-метилгуанозинового компонента кэпа [145]. Однако роль, которую играет метилирование рибозы, остается неясной.

## Геном

Геном поксвирусов представлен линейной двухцепочечной ДНК [89] размером от 85000К у парапоксвирусов [123] до почти 185000К у вируса оспы кур [71]. Все поксвирусы, за исключением парапоксвирусов, характеризуются более высоким по сравнению с эукариотической ДНК содержанием аденина и тимина — на долю А+Т в них приходится от 63 до 75% оснований [235]. Данные электронной микроскопии, а также опытов с использованием эндонуклеаз рестрикции, техники рекомбинантных ДНК и методов быстрого секвенирования недавно позволили описать основные свойства структуры этих крупных молекул ДНК. По электрофореграммам, полученным после расщепления ДНК эндонуклеазами рестрикции, можно провести довольно простое сравнение различных представителей рода ортопоксвирусов, что оказывает значительную помощь при их классификации [52, 58, 112, 237]. В результате выявилась поразительно высокая степень консерватизма нуклеотидных последовательностей в центральной области генома ортопоксвирусов. Различия сосредоточены в основном вблизи концов молекулы ДНК. Концевые фрагменты генома гипервариабельны, в них обнаруживаются крупные делеции и сложные перестройки генетического материала [59, 106, 136, 141, 155]. Совершенно иную картину фрагментации ДНК дают парапоксвирусы и авипоксвирусы — в этом случае не обнаружи-

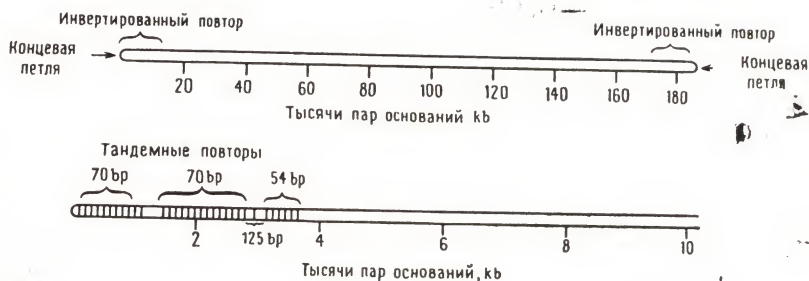


Рис. 30.2. Структура ДНК вируса осповакцины. Показан полный геном и (в увеличенном масштабе) инвертированный концевой повтор, состоящий из 10 000 bp.

вается ни сходства их с ортопоксвирусами, ни сходства между ними.

К настоящему времени наиболее детально охарактеризован геном вируса осповакцины с мол. массой 123000К (186 kb), он может служить прототипом других представителей этого семейства. Наиболее характерные особенности наблюдаются на концах или вблизи концов молекулы (рис. 30.2). Цепи ДНК не поддаются разделению даже при использовании весьма сильных денатурирующих воздействий. На основании этих данных высказано предположение, что между цепями ДНК имеются ковалентные связи [75]. Прямое определение нуклеотидной последовательности показало, что полинуклеотидные цепи на каждом из концов соединены друг с другом в виде шпильки [12]. Таким образом, геном вируса осповакцины состоит из единой неразрывной полинуклеотидной цепи, сложенной в виде линейного дуплекса. Анализ концевых шпилек показал, что они состоят почти сплошь из адениновых и тиминовых остатков, характеризуются неполным спариванием и существуют в виде двух изомерных форм, содержащих инвертированные комплементарные последовательности (рис. 30.3). Концы ДНК вируса коровьей оспы сходны или идентичны с последовательностями концов ДНК вируса осповакцины [173]. По имеющимся данным и у других поксвирусов концы генома ковалентно связаны. Такие концы, вероятно, характерны также для ДНК вируса, являющегося возбудителем африканской чумы свиней, который относится к семейству иридовирусов [151]. Это свойство характерно также для рибосомной ДНК тетрахимены [23], хромосомной ДНК дрожжей [69, 218], репликативной формы митохондриальной ДНК парамеций [183a] и репликативной формы ДНК парвовируса [216, 220]. Столь широкое распространение концевых шпилек, несомненно, связано с их ролью в



[illegible]

A    A    A    G    C    A    T    A

TACTTACCTAAATTATATATAATTTTATAATAATTTTATACTCTC  
TCATCATTTCAATATATATTTAAAAATTTAATAATTAATGACAS

10

Рис. 30.3. Нуждающаяся последовательность концевых петель ДНК вируса осповакцины. F и S обозначены альтернативные инвертированные и комплементарные последовательности. (Из [12], с разрешения авторов.)

репликации ДНК — в последнее время это представление еще более упрочилось.

Другой особенностью структуры ДНК поксвирусов является присутствие инвертированных концевых повторов различной длины [73, 112, 236]. У вируса осповакцины одна и та же последовательность в 10000 бр присутствует на обоих концах генома — в этом можно убедиться, если после разрыва концевых шпилек провести гибридизацию двух концов одноцепочечной ДНК [73]. Внутри этого длинного повтора встречается ряд коротких тандемных повторов, функция которых неизвестна [12, 234]. Именно их присутствием, по-видимому, объясняется быстрая кинетика реассоциации ДНК вируса осповакцины [77, 168]. На каждом конце ДНК вируса осповакцины, выделенного из одной изолированной бляшки, было обнаружено 13 тандемных повторов по 70 бр, 18 других тандемных повторов — тоже по 70 бр, два тандемных повтора по 125 бр и 8 тандемных повторов по 54 бр. В клонах, выделенных из различных вирусных бляшек, наблюдали вариации числа повторов по 70 бр. Установленная для этих повторов гомология последовательностей свидетельствует о том, что эти вариации возникли вследствие неравного кроссингвера [11]. Концы ДНК вируса коровьей оспы также содержат прямые повторы, сходные по последовательности с соответствующими участками ДНК вируса осповакцины [174]. Этими наборами повторов частично, но далеко не полностью объясняется вариативность последовательности на концах генома поксвирусов.

## РЕПЛИКАТИВНЫЙ ЦИКЛ

### Общие признаки

На рис. 30.4 схематически показаны последовательные этапы репродуктивного цикла вируса осповакцины.

### Адсорбция, проникновение в клетку и разделение

Первая стадия заражения состоит в адсорбции вируса и его проникновении в клетку хозяина. Изучение этого процесса велось как на внутриклеточной форме вируса осповакцины, выделенной путем механического разрушения клеток, так и на внеклеточной форме, освобождаемой из клеток в естественных условиях. В первом случае внешняя мембрана вируса сливается с клеточной плазматической мембраной [35] или с мембраной вакуоли, образованной путем инвагинации [49], что затем приводит к проникновению вирусного нуклеоида в цитоплазму. Внеклеточная форма вируса, содержащая дополнительную оболочку, быстрее и эф-

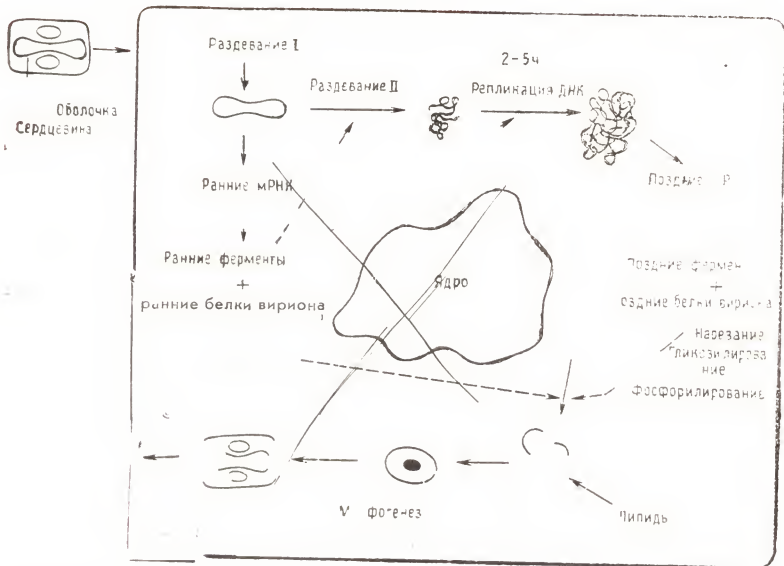


Рис. 30.4. Схема репликационного цикла вируса осповакцины.

фективное адсорбируется на поверхности клеток [167]. Это наблюдение согласуется с данными, из которых следует, что для распространения инфекции среди животных или в клеточной культуре важна именно внеклеточная форма [30, 164].

После попадания в цитоплазму вирусный нуклеоид проходит следующий этап разделения. Судя по электронным микрофотографиям, нуклеопротеиновый комплекс выходит наружу через бреши в стенках нуклеоида [48]. Биохимическим тестом на разделение вируса служит чувствительность ДНК вириона к обработке дезоксирибонуклеазой [90]. Было обнаружено, что процессу разделения препятствуют ингибиторы транскрипции и трансляции. Сначала на этом основании был сделан вывод об участии в процессе разделения специального клеточного белка, индуцируемого вирусом. В настоящее время полагают, что для разделения необходимо участие одного или нескольких ранних вирусных белков. Исследованы промежуточные стадии разборки вирусных частей и полипептидный состав соответствующих структур [83, 194].

### Ранняя транскрипция

Нуклеоиды вируса осповакцины, освобождаясь в цитоплазме, инициируют транскрипцию. В результате через несколько минут после заражения в клетке появляется функциональная мРНК,



экспонированная и полнаденилированная. Опыты по гибридизации РНК — ДНК показали, что около половины вирусного генома транскрибируется еще до репликации вирусной ДНК [26, 101, 149, 156]; опыты по трансляции в бесклеточной системе позволили сделать вывод, что набор мРНК, синтезируемых вирусным нуклеоидом *in vitro*, аналогичен набору ранних мРНК, синтезируемых *in vivo* [42]. Поскольку в вирусе содержатся готовые ферменты, которые вместе с ним проникают в клетку, ингибиторы белкового синтеза и репликации ДНК не препятствуют транскрипции. Напротив, в присутствии ингибиторов белкового синтеза, препятствующих раздеванию, синтез ранних РНК идет дольше [239]. Вероятно, важную роль в регуляции транскрипции играют избирательные физические взаимодействия РНК-полимеразы и других белков нуклеоида с различными областями генома. Пока ДНК-полимераза остается единственным известным примером задержанно-раннего белка, т. е. такого, синтез которого предшествует репликации вирусной ДНК, но зависит от предварительного синтеза ранних белков [95].

Ранние гены, которых к настоящему времени известно около 100, распределены по всей длине генома [18]; некоторые из них точно локализованы и в нескольких случаях секвенированы [225, 227, 231]. На основании этих исследований сделан важный вывод, согласно которому ранние мРНК не подвергаются сплайсингу и отщеплению 5'-концов. Если этот вывод можно будет распространить на большее число генов, отсутствие сплайсинга можно будет рассматривать как отличительный признак поксвирусов, коррелирующий с цитоплазматической локализацией их транскрипции, которая происходит с участием вирусных ферментов. Не исключено, что процессинг мРНК в данном случае проходит через отщепление 3'-конца от предшественника мРНК; возможно, именно этим объясняется синтез *in vitro* длинных цепей мРНК, наблюдающийся при недостатке АТР [158] или при использовании предварительно прогретых вирусных частиц [80]. Вместе с тем в опытах по определению размеров мишени, основанных на использовании ультрафиолетового облучения, показано отсутствие при заражении поксвирусами функциональных полицистронных РНК-предшественников как *in vitro* [29, 169], так и *in vivo* [45].

В прокариотической и эукариотической ДНК последовательность перед сайтом инициации синтеза РНК наделена особыми признаками, которые распознаются РНК-полимеразой или факторами транскрипции. Было бы интересно выяснить, используются ли подобные сигналы и поксвирусами, или у них имеются свои уникальные последовательности, с которыми специфически взаимодействует вирусная РНК-полимераза. Пока описаны последовательности ДНК, предшествующие четырем генам (рис. 30.5).



Каждая из них исключительно богата остатками аденина и тимина на протяжении 40—60 нуклеотидов перед сайтом инициации синтеза РНК, но во всех других отношениях отличается от эукариотических и прокариотических последовательностей. Недавно, используя функциональный подход, удалось показать, что фрагмент ДНК, начинающийся примерно за 230 бр до участка инициации синтеза РНК и заканчивающийся через 30 бр после этого участка, содержит транскрипционные регуляторные последовательности одного из ранних генов [113]. Был построен химерный ген, в котором этот фрагмент ДНК из 260 бр был сшит с последовательностью, кодирующей тимидинкиназу герпесвируса. После получения рекомбинанта путем его введения в вирус осповакцины была зарегистрирована экспрессия герпесвирусной тимидинкиназы. Дальнейшие опыты подобного типа должны привести к более точной идентификации регуляторных сигналов.

Нуклеотидные последовательности на 3'-концах нескольких ранних генов четко указывают на отсутствие матрицы для синтеза poly(A)-хвоста в 50—100 нуклеотидов, который содержится в мРНК вируса осповакцины. Отсутствует и последовательность, комплементарная AAUAAA, которая неизменно наблюдается примерно за 20 нуклеотидов до сайта полиаденилирования эукариотических мРНК. Пока неясно, используют ли поксвирусы в качестве сигнала полиаденилирования альтернативную последовательность или аденилатные остатки попросту добавляются к 3'-концам полностью сформированных цепей мРНК с помощью вирусной poly(A)-полимеразы. В пользу последнего свидетельствуют результаты исследований *in vitro* нуклеотидов вируса осповакцины [74]. Было обнаружено, что после облучения вирусных частиц ультрафиолетом, ведущего к образованию тиминовых димеров, укороченные (преждевременно терминированные) транскрипты все же содержат poly(A)-последовательности.

Имеются данные о модификации мРНК вируса осповакцины клеточными метилтрансферазами [25]. Вирусная мРНК, синтезируемая *in vitro*, содержит структуру типа кэп-I, в которой концевой 7-метилгуанозин соединен через трифосфатный мостик с 2'-О-метилнуклеозидом. Вирусная РНК, выделенная из цитоплазмы зараженных клеток, может содержать два идущих подряд 2'-О-метилованных нуклеозида, что характерно для структуры типа кэп-II. Кроме того, предпоследний 2'-О-метиладенозин может быть метилирован еще и по N<sup>6</sup>-положению с образованием дважды метилированного остатка аденозина. Функциональный смысл этих дополнительных метилирований, характерных также и для клеточных мРНК, пока не ясен.



## Ранние белки

Ранние вирусные мРНК вскоре после их синтеза транслируются на клеточных рибосомах. Соответствующие им белки можно метить радиоактивными аминокислотами и затем детектировать иммунологическими методами или разделять с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [64, 131, 170, 190a]. Путем гибридизации мРНК вируса осповакцины, транслируемых в бесклеточной системе, с клонированными фрагментами геномной ДНК удалось локализовать положение генов, кодирующих около 70 ранних полипептидов (табл. 30.3), но лишь совсем немногие из них удалось охарактеризовать. К их числу относятся ферменты, участвующие в процессах репликации и транскрипции вирусной ДНК, протекающих в цитоплазме зараженных клеток.

После заражения клеток различными ортопоксвирусами резко повышается активность тимидинкиназы (ТК). Вывод о том, что этот фермент кодируется вирусом, первоначально был основан на индукции фермента в ТК<sup>-</sup>-клетках. Далее удалось получить ТК<sup>-</sup>-мутанты вируса осповакцины и физически охарактеризовать сам фермент [55, 102]. Хотя размножение вируса осповакцины как в клеточной культуре, так и в организме животного может идти и в отсутствие ТК-гена, вирусный фермент может обеспечивать избирательное преимущество при размножении вируса в нереплицирующихся клетках, содержащих очень мало тимидиловой кислоты. При всей кажущейся необязательности вирусного ТК-гена он оказался необычайно полезен для генетических исследований, особенно в условиях, специально подобранных для селективного роста ТК<sup>+</sup>- или ТК<sup>-</sup>-вирусов. При использовании в качестве хозяев ТК<sup>-</sup>-клеток в присутствии метотрексата, препятствующего синтезу тимидиловой кислоты, реплицируется только ТК<sup>+</sup>-вирус. Вместе с тем добавление 5-бромдезоксинуридина, токсичного лишь после его фосфорилирования тимидинкиназой, может быть использовано для отбора ТК<sup>-</sup>-вирусов. Метод отбора ТК<sup>+</sup>-вирусов позволил точно установить положение ТК-гена в геноме путем идентификации клонированных фрагментов вирусной ДНК дикого типа, способных к «спасению» ТК<sup>-</sup>-вируса [232]. Использованы и другие методы; в частности, локализация гена была подтверждена трансляцией индивидуальных мРНК в бесклеточной системе [85] — в настоящее время этот ген полностью секвенирован [231]. Удивительно, что молекулярная масса вирусной ТК оказалась равной всего 20К — почти вдвое меньше молекулярной массы аналогичных ферментов, выделенных из прокариот, эукариот и из клеток, зараженных герпесвирусами. Более того, в последовательностях этих двух вирусных генов, кодирующих ТК, не обнаружено никакой гомологии.

Еще один фермент, синтезируемый в больших количествах

**Таблица 30.3. Трансляционная карта генома вируса осповакцины**

Фрагмент	С				Н	М	К	Р	Е
Размер, мол. масса · 10 <sup>-6</sup>	5,9	4,4	3,1	0,7	1,0	1,4	2,9	8,9	9,9
Кодирующая емкость, мол. масса · 10 <sup>-3</sup>	343	256	180	41	60	83	168	517	575
Ранние полипептиды, мол. масса · 10 <sup>-3</sup>	42 19 8	60 21 19 13 1 6	38 32 14	23 <sup>1)</sup> 21 <sup>2)</sup> 15 <sup>2)</sup> 12	54 <sup>2)</sup> 53 <sup>2)</sup> 40 21 <sup>2)</sup> 20 15 <sup>2)</sup>	54 <sup>2)</sup> 53 <sup>2)</sup> 30 <sup>2)</sup> 23	46 30 <sup>2)</sup> 16 11 9	68 62 59 54 45 39 35 33 27 17 16 16 10	95 67 <sup>2)</sup> 64 62 55 35 34 32 30 26 22 17 15
Сумма мол. масс ма- жорных белков	69	119	84	23	45	42	42	218	146
Общая сумма мол. масс	69	119	84	53	131	91	97	481	521
Поздние полипептиды	—	22	40	—	—	—	—	52 40 15	12
Сумма мол. масс ма- жорных белков	—	22	40	—	—	—	—	52	12
Общая сумма мол. масс	—	22	40	—	—	—	—	107	12
Всего	69	141	124	53	131	91	97	588	533

<sup>1)</sup> Полипептиды, экспрессия которых более выражена в присутствии ингибиторов

<sup>2)</sup> Полипептиды, являющиеся продуктами трансляции мРНК, считанной с двух со-

O	I	G	L	J	H	D	A	B	Всего
1,0	4,3	6,0	2,6	3,2	5,6	10,3	30	19	120
56	250	346	151	186	325	598	1742	1104	6970
67 <sup>2)</sup> 33 <sup>2)</sup>	80 79 33 32 25	54 33 <sup>1)</sup> 30 <sup>1)</sup>	33 <sup>1)</sup> 30 <sup>1)</sup>	110 <sup>1),2)</sup> 41 21 17	110 <sup>1),2)</sup> 40 39 14 11	86 84 79 52 34 28 27 24 17 14 12	58 45 41 40 39 37 35 31 27 24 23 20 18 16	42 35 35 31 27 19 8	
50	122	54	—	58	51	221	155	112	
50	249	122	63	134	159	457	454	197	3531
35 <sup>2)</sup>	46 35 <sup>2)</sup> 11	65 44 33 30 14 12 9	44 37 33 30 30 <sup>2)</sup> 28 19 14	36 30 <sup>2)</sup> 28 19 19 18 14	55 46 36 30 28 18 17 14 13	70 35 17 14	96 84 45 22	—	
—	11	148	45	83	68	84	151	—	
18	75	207	225	149	257	136	247	—	1495
68	324	329	288	283	416	593	701		5026

репликации ДНК, чем в присутствии ингибиторов синтеза белка.  
седних фрагментов ДНК и кодируемой наполовину каждым из фрагментов [18].



вслед за заражением клеток ортопоксвирусами, — ДНК-полимераза. ДНК-полимераза вируса осповакцины имеет мол. массу  $\sim 110\text{К}$  и характеризуется также 3'-эндонуклеазной активностью [34]. Фермент вируса дикого типа ингибируется фосфоноуксусной кислотой; тем не менее выделены мутанты, синтезирующие фермент, устойчивый к этому соединению [128]. Существование таких мутантов служит свидетельством того, что ДНК-полимераза кодируется вирусом; кроме того, эти мутанты используют для картирования гена [92].

Активность полинуклеотидлигазы, устраняющей в ДНК одноцепочечные разрывы, на ранней стадии репликации вируса осповакцины возрастает в 10 раз [192]. Однако пока нет прямых свидетельств того, что этот фермент отличается от клеточной лигазы и кодируется вирусом [209]. На ранней стадии заражения синтезируется специфическая дезоксирибонуклеаза, обладающая экзонуклеолитической активностью с щелочным рН-оптимумом, которая расщепляет предпочтительно двухцепочечную ДНК [121].

На ранних стадиях синтезируется несколько ферментов, участвующих в синтезе РНК. К ним относятся  $\text{poly(A)}$ -полимераза [31], РНК-гуанилтрансфераза, РНК-гуанин-7-метилтрансфераза и РНК-нуклеозид-2'-метилтрансфераза [27]. Вскоре после заражения вирусом осповакцины повышается также активность ферментов, участвующих в биосинтезе аргинина [233].

## Репликация ДНК

Специфическим признаком поксвирусов является цитоплазматическая локализация репликации ДНК. Радиоавтографическими исследованиями выявлены цитоплазматические центры репликации, названные «фабриками» [32]. Присутствия клеточных ядер для синтеза ДНК вируса осповакцины не требуется; это показано на клетках, из которых ядра удаляли с помощью цитохалазина В [171, 182]. Отсюда же следует, что для репликации используются преимущественно или исключительно вирусные белки. Хотя новосинтезированная вирусная ДНК иногда попадает и в ядро, пока не установлено, имеет ли это сколько-нибудь существенное значение [70, 105]. В клетках, синхронно зараженных вирусом осповакцины, репликация ДНК укладывается по времени в дискретный отрезок с 1,5 до 6 ч после заражения [91, 189].

Учитывая огромные размеры генома поксвирусов, не приходится удивляться, что выяснение деталей репликации продвигается медленно. По предварительным данным нескольких лабораторий репликация начинается на обоих концах генома; при этом происходит расплетание цепей и образование небольших фрагментов ДНК, ковалентно связанных с РНК-затравками [62, 65,

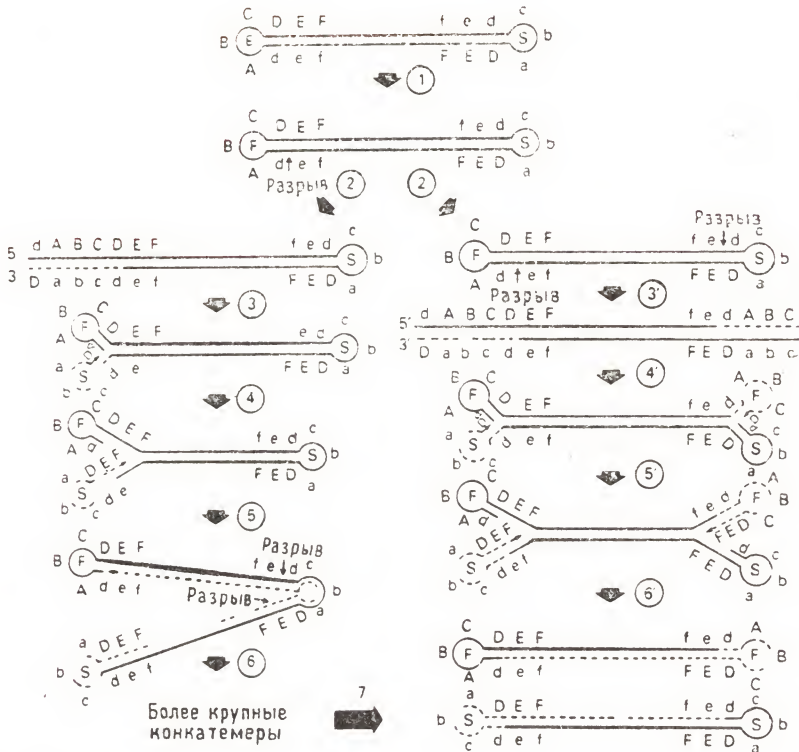


Рис. 30.6. Самозатравочная модель репликации ДНК вируса осповакцины. F и S обозначены альтернативные инвертированные и комплементарные последовательности, присутствующие на концах ДНК вируса осповакцины (рис. 30.3). Левая схема дана в предположении, что репликация молекулы одноцепочечной ДНК начинается только на одном конце. На правой схеме изображена инициация одновременно на двух концах. (Из [131], с разрешения авторов.)

66, 180, 181]. Однако, поскольку ДНК-полимеразы не способны иницировать синтез ДНК, требуются специальные механизмы заполнения пробелов, остающихся на 5'-концах линейной ДНК после удаления РНК-затравки. Установление шпильчатой структуры концов генома вируса осповакцины позволило предложить механизм [12], подобный тому, который был постулирован для репликации одноцепочечной ДНК парвовируса [220] и эукариотических теломеров [13]. Этот механизм включает образование одноцепочечных разрывов вблизи конца генома, приводящих к появлению 3'-концов, способных выполнять роль затравки (рис. 30.6). С его помощью можно объяснить такие особенности, как восстановление неполностью спаренных шпилек и прямые и обратные перестройки последовательности («флип-флоп»).

С этим механизмом согласуются данные об образовании одноцепочечных разрывов вблизи концов родительского генома вскоре после заражения и их воссоединении на более поздней стадии [62, 175, 180], а также данные об образовании быстро седиментирующих конкатемерных форм ДНК [4, 137, 139].

Мойер и Грэйвс [139] выдвинули предположение, что зеркально обращенные повторы на концах ДНК, а также делеции и транспозиции, наблюдаемые у мутантных форм вируса оспы кролика, могут быть следствием крупных делеций внутри конкатемеров. Делеции зеркально обращенных концов могут объясняться образованием кольцевых форм ДНК [122]. Были предприняты попытки изучать ход репликации ДНК вируса осповакцины *in vitro*. Как было показано, в неочищенных цитоплазматических экстрактах сохраняется ограниченная способность вирусной ДНК к репликации [63, 108]; здесь происходит заполнение пробелов и воссоединение одноцепочечных разрывов в полностью сформированных, но не имеющих концевых ковалентных связей цепях ДНК [176]. Для этого необходимо присутствие АТР,  $Mg^{2+}$  и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Как уже упоминалось, выделена, очищена и охарактеризована кодируемая вирусом осповакцины ДНК-полимераза. *In vitro* она заполняет пустые промежутки по принципу репарации ДНК и обладает 3'-экзонуклеазной активностью, что позволяет говорить о ее корректирующей функции [34]. Недавно выделенные температурочувствительные мутанты вируса осповакцины с ДНК-генотипом могут быть использованы при непермиссивных температурах в качестве средства идентификации дополнительных белков, участвующих в процессе репликации [38, 40, 51, 56, 107]. Однако число выделенных мутантов подобного типа весьма невелико; учитывая сложность репликации и вероятное участие многих вирусных факторов, можно думать, что таких мутантов должно быть намного больше.

### Поздняя транскрипция

Начало репликации ДНК служит вестником драматических изменений в экспрессии генов. Как показали опыты по гибридизации ДНК—РНК, на поздних стадиях транскрибируется почти весь геном [26, 149, 156]. Эти данные оказались несколько неожиданными, поскольку из других опытов следовало, что большинство ранних белков после репликации ДНК более не синтезируются. Вторым непонятным свойством поздней РНК была ее способность к самоотжигу или к отжигу с ранней РНК с образованием гибридов, устойчивых к рибонуклеазе [28, 39, 223]. После того как была разработана технология исследования индивидуальных РНК, каждое из этих явлений удалось правдоподобно объяснить. Обнаружено, что поздние транскрипты не имеют фик-



сированных 3'-концов и что мРНК, кодирующая какой-то один белок, может варьировать по длине по меньшей мере в несколько раз [46]. По-видимому, поздние РНК захватывают также и ранние гены, и ряд поздних генов в той же или в противоположной цепи. В последнем случае РНК поддается отжигу с образованием дуплексов. Почему поздние РНК не способны к дискретной терминации, остается загадкой: либо у поздних генов отсутствует сигнал терминации, либо сказывается недостаток каких-то белковых факторов.

Пока еще нет данных по нуклеотидным последовательностям поздних генов, поэтому трудно сказать, какой механизм используется для регуляции транскрипции. Возможно, ранние и поздние гены имеют разные промоторные последовательности и последние опознаются модифицированной или даже новой РНК-полимеразой. Поскольку синтез поздней РНК не идет при подавлении репликации ДНК ингибиторами, а также при заражении клеток температурочувствительными мутантами, у которых при непермисивных температурах блокирован синтез ДНК, какую-то роль должны играть свойства новореплицированной ДНК. В этой связи уместно напомнить о существовании нескольких классов температурочувствительных мутантов, способных синтезировать ДНК, но не способных к синтезу поздних белков [40]. Один из этих классов интересен тем, что фенотип его представителей, определяемый abortивным синтезом поздних белков, несет в себе те же черты, которые могут проистекать от воздействия на репликацию поксвирусов изатин- $\beta$ -тиосемикарбазона. Последний прерывает синтез поздних белков в зараженных клетках, что нельзя удовлетворительно объяснить нарушениями в синтезе или процессинге мРНК, а также понижением ее стабильности [44].

Вместе с тем стабильность мРНК может служить фактором, влияющим на экспрессию ранних и поздних генов. Создается впечатление, что с ходом цикла инфекции стабильность мРНК постепенно снижается [176, 196]. Повышенная скорость деградации мРНК в сочетании с другими факторами регуляции транскрипции приводит к быстрым изменениям в составе популяции мРНК.

Регуляция происходит и на уровне трансляции. Первоначально, исходя из данных по действию ингибиторов синтеза РНК и белков, предотвращающих отключение синтеза тимидинкиназы вируса коровьей оспы, было выдвинуто предположение о существовании особого супрессорного белка [119, 120]. Недавно в подкрепление этой идеи получены данные о том, что мРНК для тимидинкиназы и других белков могут быть выделены из зараженных клеток даже после прекращения синтеза этих белков [84, 224].

Ряд данных указывает на участие в цикле развития поксвирусов клеточного ядра или РНК-полимеразы II. В клетках, лишен-

ных ядра, наблюдается снижение титра вируса [182]; то же происходит в результате предварительной обработки клеток  $\alpha$ -аманитином, специфически ингибирующим клеточную РНК-полимеразу II [86, 202]. Кроме того, отмечено присутствие вирусных РНК и ДНК в очищенных клеточных ядрах [24, 70]. Возможность участия клеточных ферментов в транскрипции некоторых генов вируса осповакцины представляется весьма интригующей, но чтобы доказать это, нужны более прямые данные.

### Поздние белки

Переход от синтеза ранних к синтезу поздних белков легко регистрируется по радиоавтографам полиакриламидных гелей, содержащих белки, меченные радиоактивными аминокислотами в разные промежутки времени [131, 170]. Детальный анализ показывает, что имеются по крайней мере два класса поздних белков, к одному из которых относятся белки, синтезируемые сразу после репликации ДНК, а к другому — белки, синтезируемые с некоторой задержкой. Отбирая для трансляции в бесклеточной системе поздние мРНК, гибридизующиеся с очищенными [38] или клонированными [18] рестрикционными фрагментами ДНК, удалось локализовать положение в геноме вируса осповакцины около 40 генов поздних полипептидов. Эти гены распределены по всему геному, но в несколько большей степени концентрируются в центральной области (табл. 30.3).

Опыты с импульсным введением метки указывают, что несколько поздних полипептидов, включая главные структурные белки нуклеоида, подвергаются протеолитическому процессингу [130], который, по-видимому, сопряжен со сборкой вирусных частиц, поскольку такие препараты, как рифампицин, препятствующие созреванию вируса, подавляют и протеолиз [99]. Данные о сопряжении процессинга белков со сборкой вируса получены и на нескольких температурочувствительных мутантах [201].

К белкам, синтезируемым на поздних стадиях, относятся структурные белки вирусных частиц [133], а также некоторые ферменты, в том числе дезоксирибонуклеазы с кислым [121] и нейтральным [177] оптимумом pH, а также обе нуклеозидтрифосфатфосфогидролазы [160, 177].

### Сборка вируса, созревание и выход из клетки

Электронно-микроскопический анализ тонких срезов клеток, зараженных представителями поксвирусов нескольких родов, привел к общей схеме разворачивания событий [50], показанной на рис. 30.7. Начальные стадии образования вириона происходят



Рис. 30.7. Схематическое изображение состояния клетки через различные промежутки времени после заражения вирусом осповакцины.

в ограниченных гранулярных электроноплотных областях цитоплазмы, расположенных в стороне от клеточных мембран. Первые появляющиеся при этом морфологически различные структуры представляют собой серповидные (куполообразные в трех измерениях) образования, состоящие из бислойной мембраны с выступающим из нее с выпуклой стороны частоколом ворсинок и гранулярным материалом вблизи вогнутой поверхности. Какую-то ясность относительно происхождения этих образований внесли опыты с использованием рифампицина. В присутствии этого антибиотика наблюдается накопление в клетке вирусных мембран с неупорядоченной структурой, лишенных ворсинок и неспособных к созреванию [78, 138, 146]. Примечательно, что через несколько минут после удаления рифампицина мембраны покрываются ворсинками и приобретают характерную выпуклую форму (рис. 30.8). Ингибиторы синтеза РНК и белков эту стадию не подавляют, что свидетельствует о прямом воздействии рифампицина на процесс сборки и прикрепления ворсинок. Вероятно, именно ворсинки придают мембране жесткую выпуклую форму и в конечном итоге определяют размеры незрелых вирусных частиц. Есть данные, согласно которым ворсинкам можно приписать роль строительных лесов, — потом они заменяются на находящиеся на поверхности трубчатые элементы [61].



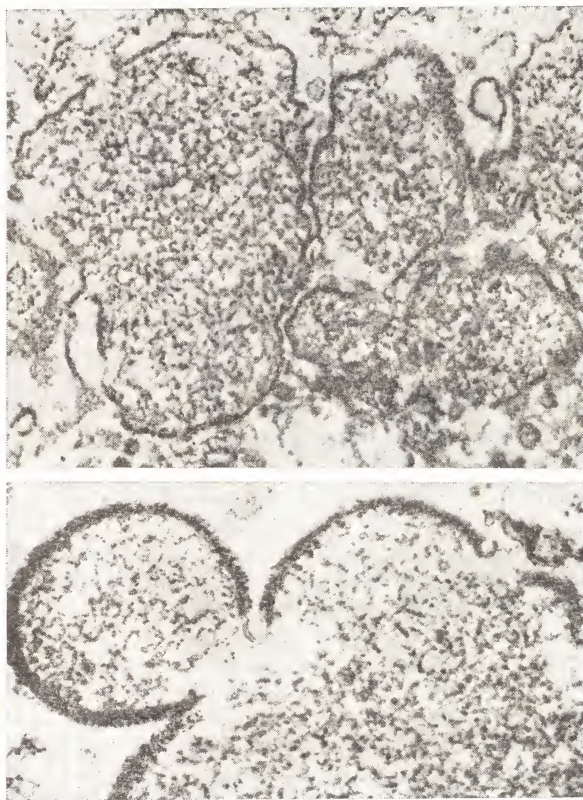


Рис. 30.8. Электронная микрофотография незрелых частиц вируса осповакцины. Снимки сделаны с тонких срезов клеток через 8 ч после заражения в присутствии рифампицина (*вверху*) и через 10 мин после удаления антибиотика (*внизу*) [78].

На последующих стадиях незрелые вирусные оболочки принимают сферическую форму благодаря проникновению внутрь гранулярного матрикса плотной массы нуклеопротеина. Судя по отдельным электронно-микроскопическим снимкам, нуклеопротеин проникает внутрь оболочки непосредственно перед ее полным замыканием [125]. Поскольку в областях сборки вируса полисом нет, вирусные белки должны как-то переноситься от места их синтеза. Пока неясно, как доставляются белки в зрелые частицы — охватываются ли они оболочкой или инъецируются внутрь, происходит ли это одновременно для всех белков или последовательно по мере созревания мембраны. Цитохимические исследования указывают на то, что по крайней мере один фермент —

нуклеозидтрифосфатаза — уже присутствует в частице до того, как начинают проступать очертания вирусного нуклеоида и боковых тел [76]. Дальнейшие стадии формирования вирусных частиц, в ходе которых возникает сложная организация внутренних и наружных компонентов, должны сопровождаться непрерывно идущим синтезом белков.

Биохимическое описание сборки вирусных частиц существенно отстает от морфологического — частично из-за трудностей, связанных с выделением частиц на различных стадиях созревания [195]. Уже упоминалось о вероятном сопряжении с процессом сборки протеолитического процессинга структурных белков. По-видимому, важную роль в дальнейших исследованиях может сыграть использование температурочувствительных мутантов вируса осповакцины, у которых при непермиссивных температурах блокированы различные стадии созревания [51].

Зрелые частицы вируса осповакцины покидают область сборки и перемещаются к периферии клетки. При изучении неповрежденных зараженных клеток с помощью высоковольтной электронной микроскопии удалось выявить мембраноподобные чехлы, которые окружают зрелые вирионы, расположенные вдоль цитоплазматических нитей [215]. Зрелые вирионы сначала нанизаны на кончики особых микроволокон, а затем отделяются от них и выходят в среду. Как показано в иммунофлуоресцентных исследованиях, эти микроволокна относятся к актинсодержащим микрофиламентам цитоскелета [82]. Двуслойные мембраны, окружающие зрелые вирусные частицы, по-видимому, формируются из материала аппарата Гольджи [87, 126]. Далее наблюдается их слияние с цитоплазматической мембраной, в результате чего происходит экстернализация вириона, который остается окруженным одним слоем мембраны.

Несмотря на существование такого механизма выхода вирусных частиц из клеток, большинство частиц ортопоксвирусов в тканевой культуре в конце цикла развития остается внутри клеток. По этой причине значение внеклеточной формы вируса до недавнего времени оставалось неясным. Когда выяснилось, что антитела, полученные иммунизацией кроликов большими дозами инактивированной внутриклеточной формы вируса осповакцины, не защищают животных и тканевые культуры от заражения, некоторые исследователи пришли к заключению, что внеклеточный вирус имеет особые антигенные свойства, которые важны при естественном распространении инфекции [3]. В последующих опытах была четко показана важная роль одетых в оболочку внеклеточных вирусных частиц для широкого распространения вирусной инфекции [30, 164]. Относительные количества внеклеточной формы вируса осповакцины могут меняться от 1 до 30% всех вирусных частиц в зависимости от штамма вируса и типа

клеток, однако какой-либо корреляции этих вариаций с общим числом вирусных частиц и размерами бляшек не замечено [163]. Непонятный ранее факт, связанный с включением вирусных гликопротеинов в клеточные мембраны [132], стал понятен после того, как в оболочке внеклеточного вируса обнаружили семь гликопротеинов [162]. Интересно отметить, что ингибиторы гликозилирования, такие, как 2-дезоксид-Д-глюкоза и глюкозамин, препятствуют выходу вируса осповакцины из клетки [166]. Выходу вирусных частиц из клеток препятствует также  $N_1$ -изоникотинил- $N_2$ -3-метил-4-хлорбензоилгидразин, который, по-видимому, мешает одеванию вирионов во внутриклеточные цитоплазматические мембраны [97, 165].

Для некоторых поксвирусов — вируса коровьей оспы, эктромеллии, куриной оспы — характерно погружение многих находящихся в цитоплазме вирусных частиц в плотный белковый матрикс. Эти образования были названы включениями А-типа в отличие от включений В-типа, представляющих собой участки, где происходит репликация и сборка вируса [98]. Сходные включения, образующиеся вокруг вирусов оспы насекомых, по-видимому, защищают их от воздействия среды после разрушения зараженных личинок [22]. Внедрившись в новую личинку, вирусные частицы освобождаются из белкового матрикса в кишечнике личинки при щелочных рН.

## ПЕРЕСТРОЙКА КЛЕТОЧНОГО СИНТЕЗА МАКРОМОЛЕКУЛ

### Синтез белков

Заражение тканевых культур вирусом осповакцины и другими ортопоксвирусами приводит к глубоким изменениям в клетке [7]: изменению проницаемости мембран [33], подавлению синтеза ДНК, РНК и белков. Очень сильное воздействие оказывается на синтез белков [64, 127], чему посвящены весьма обширные исследования. Результаты экспериментов, выполненных в нескольких лабораториях, свидетельствуют о том, что отключение синтеза клеточных белков может происходить и в отсутствие экспрессии вирусных генов. Следовательно, источником воздействия должен быть белок, содержащийся непосредственно в вирусной частице. Кандидатом на эту роль предлагались поверхностные трубчатые структуры [118] и 11К-фосфопротеин [20]. Вероятно, синтез блокируется на уровне ингибирования образования комплекса метионил-тРНК с 40S-субчастицей рибосом [172]. Имеются косвенные данные, согласно которым некоторые ранние вирусные белки создают условия, при которых возможен синтез вирусных, но не клеточных белков [17а, 129]. По всей вероятно-



сти, с началом экспрессии вирусных генов включаются дополнительные механизмы подавления синтеза клеточных белков [8]. В частности, анализ разновидностей мРНК, присутствующих в цитоплазме, указывает на то, что через несколько часов после множественного заражения вирусом осповакцины хозяйские транскрипты составляют относительно низкую долю [26, 43]. При этом наблюдается весьма высокая скорость деградации актиновой и тубулиновой мРНК [183с].

### Синтез нуклеиновых кислот

Обнаружено ингибирующее действие вируса на синтез и процессинг клеточных мРНК [17b, 88, 190b]. Особенно внушительно выглядит практически полная остановка переноса рибосомной РНК в цитоплазму сразу после заражения вирусом осповакцины. Пока неясно, можно ли подавление синтеза РНК считать вторичным относительно ингибирования синтеза хозяйских белков. Репликация ядерной ДНК тоже подавляется, возможно из-за действия ДНКаз, кодируемых вирусом осповакцины [151].

В отличие от ортопоксвирусов, оказывающих на клетки быстрое разрушающее действие, заражение вирусом оспы кур [36], вирусом фибромы Шоупа [198], вирусом Яба [2, 16] и вирусом контагиозного моллюска [110, 229] может приводить к гиперплазии и даже к образованию опухолей на коже животного. В некоторых случаях заражение клеток в тканевой культуре стимулировало синтез ДНК и приводило к потере контактного торможения [9a, 47, 124, 221]. При этом, как правило, какие-либо данные о встраивании вирусной ДНК в клеточный геном отсутствуют. Полагают, однако, что заражение опухолевым вирусом Яба может вызывать трансформацию клеток [188].

### МУТАНТЫ

#### Условно-летальные мутанты

Температурочувствительные условно-летальные мутанты вирусов осповакцины и оспы кроликов были выделены либо как спонтанно возникающие формы, либо с помощью искусственного мутагенеза [37, 40, 51, 54, 67, 153]. Классическими генетическими методами полученные мутанты были отнесены к разным группам комплементации и затем по частотам рекомбинаций было установлено относительное расположение мутаций на генетической карте. Однако найденные мутации пока что затрагивают лишь небольшую долю общего числа генов. Были исследованы фенотипические следствия мутаций, сказывающиеся на ходе синтеза ДНК, синтеза ранних и поздних белков, а также на ходе вирус-

ного морфогенеза, — обо всех этих проявлениях уже упоминалось в соответствующих разделах данной главы. Ускорению прогресса в этой области сильно способствовало использование в последние годы метода «спасения маркера» для физического картирования температурочувствительных и других мутаций [41, 147, 191, 232]. При этом в зараженные клетки вводят преципитированную фосфатом кальция ДНК вируса дикого типа. Используя фрагменты ДНК, можно достаточно точно установить положение исследуемой мутации. По-видимому, при этом в цитоплазме зараженных клеток происходят рекомбинации введенных фрагментов ДНК с гомологичными участками генома.

### Мутанты, устойчивые к ингибиторам

Репликации поксвирусов препятствует ряд веществ. Выделены мутанты, устойчивые к 5-бромдезоксинуридину [55], рифампицину [217], изатин-β-тиосемикарбазону [100], фосфоноацетату [41a] и 2'-О-метиладенозину [183b]. Ранее в этой главе уже вкратце говорилось о возможных механизмах действия некоторых из этих веществ. Мутации, придающие вирусу устойчивость к 5-бромдезоксинуридину и фосфоноацетату, локализованы соответственно в генах тимидинкиназы и ДНК-полимеразы, положение которых точно установлено методом «спасения маркера» [92, 232].

### Мутанты с измененным спектром хозяев

Более 20 лет назад была выделена серия мутантов вируса оспы кроликов, неспособных продуцировать геморрагические «оспины» на хориоаллантоисной мембране куриных эмбрионов [67]; недавно было показано, что эти мутации являются результатом дупликаций и транспозиций участков ДНК, находящихся вблизи концов генома [141, 143]. Некоторые из этих «оспинных» мутантов имеют более узкий спектр хозяев по сравнению с вирусом дикого типа и дают фенотипические отклонения при заражении непермиссивных клеток [140, 142]. Для вируса осповакцины также были описаны мутанты по спектру хозяев [53].

### Гибридные вирусы

На основе модифицированного метода «спасения маркера» были сконструированы гибридные вирусы осповакцины, содержащие чужеродные гены [113, 154]. Для достижения эффективной экспрессии последовательность чужеродного гена вставляют после одного из промоторов вируса осповакцины [135]. Особенно важно то, что такие гибриды, содержащие  $\geq 25\,000$  бп чужерод-

ной ДНК, тем не менее сохраняют инфекционность [205]. При использовании для вакцинации животных гибридных вирусов, содержащих ген поверхностного антигена вируса гепатита В и ген гемагглютиниона вируса гриппа, наблюдался высокий уровень продукции специфических антител; в обоих случаях была продемонстрирована защита против вирусной инфекции [206, 207, неопубликованные данные]. Таким образом, генетическая инженерия инфекционных гибридных вирусов может быть использована для приготовления вакцин в медицинских и ветеринарных целях.

### Литература

1. Andrewes C., Pereira H. G., Wildy P. (1978). Viruses of Vertebrates, pp. 356—389, Balliere Tindall, London.
2. Andrewes C., Allison A. C., Armstrong J. A., Bearcroft G., Niven J. S. F., Pereira H. S. (1959). A virus disease of monkeys causing large superficial growths, *Acto Unio Int. Contra Cancrum*, **15**, 760—763.
3. Appleyard G., Haper A. J., Boulter E. A. (1971). An antigenic difference between intracellular and extracellular rabbitpox virus, *J. Gen. Virol.*, **13**, 9—17.
4. Archard L. C. (1979). De novo synthesis of two classes of DNA induced by vaccinia virus infection of HeLa cells, *J. Gen. Virol.*, **42**, 223—229.
5. Arita M., Tagaya I. (1980). Virion polypeptides of poxviruses, *Arch. Virol.*, **63**, 209—225.
6. Arzoglou P., Drillien R., Kirn A. (1978). Evidence for an alkaline protease in vaccinia virus, *Virology*, **95**, 211—214.
7. Bablanian R., Baxt B., Sonabend J. A., Esteban M. (1978). Studies on the mechanisms of vaccinia virus cytopathic effects. II. Early cell rounding is associated with virus polypeptide synthesis, *J. Gen. Virol.*, **39**, 403—413.
8. Balbanian R., Coppola G., Scribani S., Esteban M. (1981). Inhibition of protein synthesis by vaccinia virus. IV. The role of low molecular weight viral RNA in the inhibition of protein synthesis, *Virology*, **112**, 13—24.
- 9a. Barbanti-Brodano G., Mannini-Palenzona A., Varoli O., Portolani M., LaPlaca M. (1974). Abortive infection and transformation of human embryonic fibroblasts by *Moluscum contagiosum* virus, *J. gen. Virol.*, **24**, 237—246.
- 9b. Barbosa E., Moss B. (1978). mRNA (nucleoside-2'-)-methyltransferase from vaccinia virus. Purification and physical properties, *J. Biol. Chem.*, **253**, 7692—7697.
- 9c. Barbosa E., Moss B. (1978). mRNA (nucleoside-2'-)-methyltransferase from vaccinia virus. Characteristics and substrate specificity, *J. Biol. Chem.*, **253**, 7698—7702.
10. Baroudy B. M., Moss B. (1980). Purification and characterization of a DNA-dependent RNA polymerase from vaccinia virions, *J. Biol. Chem.*, **255**, 4372—4380.
11. Baroudy B. M., Moss B. (1982). Sequence homologies of diverse length tandem repetitions near ends of vaccinia virus genome suggest unequal crossing over, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 5673—5679.
12. Baroudy B. M., Vankatesan S., Moss B. (1982). Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain, *Cell*, **28**, 315—324.
13. Bateman A. J. (1975). Simplification of palindromic telomere theory, *Nature*, **253**, 379—380.



14. Bauer W. R., Ressner E. C., Kates J., Patzke J. (1977). A DNA nicking-closing enzyme encapsidated in vaccinia virus: Partial purification and properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1841—1845.
15. Baxby D. (1977). Possible antigenic sub-divisions within the variola/vaccinia subgroup of poxviruses, *Arch. Virol.*, **54**, 143—145.
16. Bearcroft W. G. C., Jamieson M. F. (1958). Yaba simian tumour virus was isolated from tumours observed in monkeys in Yaba, Nigeria, *Nature*, **182**, 195—196.
- 17a. Beaud G., Dru A. (1980). Protein synthesis in vaccinia virus-infected cells in the presence of amino acid analogs: A translational control mechanisms, *Virology*, **100**, 10—21.
- 17b. Becker Y., Joklik W. K. (1964). Messenger RNA in cells infected with vaccinia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**, 577—585.
18. Belle Isle H., Venkatesan S., Moss B. (1981). Cell-free translation of early and late mRNAs selected by hybridization to cloned DNA fragments derived from the left 14 million to 72 million daltons of the vaccinia virus genome, *Virology*, **112**, 306—317.
19. Bellett A. J. D., Fenner F. (1968). Studies of base-sequence homology among some cytoplasmic deoxyriboviruses of vertebrate and invertebrate animals, *J. Virol.*, **2**, 1374—1380.
20. Ben-Hamida F., Person A., Beaud G. (1983). Solubilization of a protein synthesis inhibitor from vaccinia virions, *J. Virol.*, **45**, 452—455.
21. Bergoin M., Dales S. (1971). Comparative observations on poxviruses of invertebrates and vertebrates. In: *Comparative Virology*, ed. by K. Maramorosch and E. Kurstak, pp. 171—205, Academic Press, New York.
22. Bergoin M., Devauchelle G., Vago C. (1971). Electron microscopy study of *Melolontha* poxvirus: The fine structure of occluded virions, *Virology*, **43**, 453—467.
23. Blackburn E. H., Gall J. G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*, *J. Mol. Biol.*, **120**, 33—53.
24. Bolden A., Pedrali-Noy G., Weissbach A. (1979). Vaccinia virus infection of the HeLa cells. II. Disparity between cytoplasmic and nuclear viral specific RNA, *Virology*, **94**, 138—145.
25. Boone R. F., Moss B. (1977). Methylated 5' terminal sequences of vaccinia virus mRNA species made in vivo at early and late times after infection, *Virology*, **79**, 67—80.
26. Boone R. F., Moss B. (1978). Sequence complexity and relative abundance of vaccinia virus mRNA's synthesized in vivo and in vitro, *J. Virol.*, **26**, 554—569.
27. Boone R. F., Ensinger M. J., Moss B. (1977). Synthesis of mRNA guanylttransferase and mRNA methyltransferases in cells infected with vaccinia virus, *J. Virol.*, **21**, 475—483.
28. Boone R. F., Parr R. P., Moss B. (1979). Intermolecular duplexes formed from polyadenylated vaccinia virus RNA, *J. Virol.*, **301**, 365—374.
29. Bossart W., Nuss D. L., Paoletti E. (1978). Effect of UV irradiation on the expression of vaccinia virus gene products synthesized in a cell-free system coupling transcription and translation, *J. Virol.*, **26**, 673—680.
30. Boulter E. A., Appleyard G. (1973). Differences between extracellular and intracellular forms of poxviruses and their implications, *Prob. Med. Virol.*, **16**, 86—108.
31. Brakel C., Kates J. R. (1974). Poly(A) polymerase from vaccinia virus-infected cells. I Partial purification and characterization, *J. Virol.*, **14**, 715—723.
32. Cairns J. (1960). The initiation of vaccinia infection, *Virology*, **11**, 603—623.

33. Carrasco L., Esteban M. (1982). Modification of membrane permeability in vaccinia virus infected cells, *Virology*, **117**, 62—69.
34. Chalberg M. D., Englund P. T. (1979). Purification and properties of the deoxyribonucleic acid polymerase induced by vaccinia virus, *J. Biol. Chem.*, **254**, 7812—7819.
35. Chang A., Metz D. H. (1976). Further investigations on the mode of entry of vaccinia virus into cells, *J. Gen. Virol.*, **32**, 275—282.
36. Cheevers W. P., O'Callaghan D. J., Randall C. C. (1968). Biosynthesis of host and viral deoxyribonucleic acid during hyperplastic fowlpox infection in vivo, *J. Virol.*, **2**, 421—429.
37. Chernos V. I., Belanov E. G., Vasilieva N. N. (1978). Temperature sensitive mutants of vaccinia virus. I. Isolation and preliminary characterization, *Acta Virol.*, **22**, 81—90.
38. Chipchase M., Schwendimann F., Wyler R. (1980). A map of the late proteins of vaccinia virus, *Virology*, **105**, 261—264.
39. Colby C., Jurale C., Kates J. R. (1971). Mechanism of synthesis of vaccinia virus double-stranded ribonucleic acid in vivo and in vitro, *J. Virol.*, **7**, 71—76.
40. Condit R. C., Motyczka A. (1981). Isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of vaccinia virus, *Virology*, **113**, 224—241.
41. Condit R. C., Moticzka A., Spizz G. (1983). Isolation, characterization, and physical mapping of temperature-sensitive mutants of vaccinia virus, *Virology*, **128**, 429—443.
42. Cooper J. A., Moss B. (1978). Transcription of vaccinia virus mRNA coupled to translation in vitro, *Virology*, **88**, 149—165.
43. Cooper J. A., Moss B. (1979). In vitro translation of immediate early, early, and late classes of RNA from vaccinia virus-infected cells, *Virology*, **96**, 368—380.
44. Copper J. A., Moss B., Katz E. (1979). Inhibition of vaccinia virus late protein synthesis by isatin- $\beta$ -thiosemicarbazone. Characterization and in vitro translation of viral mRNA, *Virology*, **96**, 381—392.
45. Cooper J. A., Wittek R., Moss B. (1981). Hybridization selection and cell-free translation of mRNA's encoded within the inverted terminal repetition of the vaccinia virus genome, *J. Virol.*, **37**, 284—294.
46. Cooper J. A., Wittek R., Moss B. (1981). Extension of the transcriptional and translational map of the left end of the vaccinia virus genome to 21 kilobase pairs, *J. Virol.*, **39**, 733—745.
47. Crouch N. A., Hinze H. C. (1977). Modification of cultured rabbit cells by ultraviolet-inactivated noncytotoxic Shope fibroma virus (39843), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **155**, 523—527.
48. Dales S. (1965). Relation between penetration of vaccinia, release of viral DNA, and initiation of genetic functions. In: *Perspectives in Virology*, Vol. 4, ed. by M. Pollard, pp. 47—71, Harper and Row, New York.
49. Dales S., Kajioke R. (1964). The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain L cells. I. Uptake and penetration, *Virology*, **24**, 278—294.
50. Dales S., Pogo B. G. T. (1981). *Biology of Poxviruses* (Virology Monographs, Vol. 18), ed. by D. W. Kingsbury and H. Zur Hausen, Springer-Verlag, New York.
51. Dales S., Milovanovitch V., Pogo B. G. T., Weintraub S. B., Huima T., Wilton S., McFadden G. (1978). Biogenesis of vaccinia: Isolation of conditional lethal mutants and electron microscopic characterization of their phenotypically expressed defects, *Virology*, **84**, 403—428.
52. DeFilippes F. M. (1982). Restriction enzyme mapping of vaccinia virus DNA, *J. Virol.*, **43**, 136—139.
53. Drillien R., Koehren F., Kirn A. (1981). Host range deletion mutant of vaccinia virus defective in human cells, *Virology*, **11**, 488—499.

54. *Drillien R., Spehner D., Kirn A.* (1982). Complementation and genetic linkage between vaccinia virus temperature-sensitive mutants, *Virology*, **113**, 372—381.
55. *Dubbs D. R., Kit S.* (1964). Isolation and properties of vaccinia mutants deficient in thymidine kinase-inducing activity, *Virology*, **22**, 214—225.
56. *Ensinger M. J.* (1982). Isolation and genetic characterization of temperature sensitive mutants of vaccinia virus WR, *J. Virol.*, **43**, 778—790.
57. *Esposito J. J., Obijeski J. F., Nakano J. H.* (1977). Serological relatedness of monkeypox, variola, and vaccinia viruses, *J. Med. Virol.*, **1**, 35—47.
58. *Esposito J. J., Obijeski J. F., Nakano J. H.* (1978). Orthopoxvirus DNA: Strain differentiation by electrophoresis of restriction endonuclease fragmented virion DNA, *Virology*, **89**, 53—66.
59. *Esposito J. J., Cabradilla C. D., Nakano J. H., Obijeski J. F.* (1981). Intra-genomic sequence transposition in monkey-pox virus, *Virology*, **109**, 231—240.
60. *Essani K., Dales S.* (1979). Biogenesis of vaccinia: Evidence for more than 100 polypeptides in the virion, *Virology*, **95**, 385—394.
61. *Essani K., Dugre R., Dales S.* (1982). Biogenesis of vaccinia: Involvement of spicules of the envelope during virion assembly examined by means of conditional lethal mutants and serology, *Virology*, **118**, 279—292.
62. *Esteban M., Holowczak J. A.* (1977). Replication of vaccinia DNA in mouse L cells. I. In vivo DNA synthesis, *Virology*, **78**, 57—75.
63. *Esteban M., Holowczak J. A.* (1977). Replication of vaccinia DNA in mouse L cells. II. In vitro DNA synthesis in cytoplasmic extracts, *Virology*, **78**, 76—86.
64. *Esteban M., Metz D. H.* (1973). Early virus protein synthesis in vaccinia virus-infected cells, *J. Gen. Virol.*, **19**, 201—216.
65. *Esteban M., Flores L., Holowczak J. A.* (1977). Topography of vaccinia virus DNA, *Virology*, **82**, 163—181.
66. *Esteban M., Flores L., Holowczak J. A.* (1977). Model for vaccinia virus DNA replication, *Virology*, **83**, 467—473.
67. *Fenner F., Sambrook J.* (1966). Conditional lethal mutants of rabbitpox virus. II. Mutants (p) that fail to multiply in Pk-2a cells, *Virology*, **28**, 600—609.
68. *Fenner F., Woodroffe G. M.* (1960). The reactivation of poxviruses. II. The range of reactivating viruses, *Virology*, **11**, 185—201.
69. *Forte M. A., Fangman W. L.* (1979). Yeast chromosomal DNA molecules have strands which are cross-linked at their termini, *Chromosoma*, **72**, 131—150.
70. *Gafford L. G., Randall C. C.* (1976). Virus-specific DNA and DNA in nuclei of cells infected with fowpox virus, *Virology*, **69**, 1—14.
71. *Gafford L. G., Mitchell E. R., Randall C. C.* (1978). A comparison of sedimentation behavior of three poxvirus DNAs, *Virology*, **89**, 229—239.
72. *Garon C. F., Moss B.* (1971). Glycoprotein synthesis in cells infected with vaccinia virus. II. A glycoprotein component of the virion, *Virology*, **46**, 233—246.
73. *Garon C. F., Barbosa E., Moss B.* (1978). Visualization of an inverted terminal repetition in vaccinia virus DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4863—4867.
74. *Gershowitz A., Moss B.* (1979). Abortive transcription products of vaccinia virus are guanylated, methylated, and polyadenylated, *J. Virol.*, **31**, 849—853.
75. *Geshelin P., Berns K. I.* (1974). Characterization and localization of the naturally occurring crosslinks in vaccinia virus DNA, *J. Mol. Biol.*, **88**, 785—796.
76. *Gold P., Dales S.* (1968). Localization of nucleotide phosphohydrolase within vaccinia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**, 845—852.



77. Grady L. J., Paoletti E. (1977). Molecular complexity of vaccinia DNA and the presence of reiterated sequences in the genome, *Virology*, **79**, 337—341.
78. Grimley P. M., Rosenblum E. N., Mims S. J., Moss B. (1970). Interruption by rifampin of an early stage in vaccinia virus morphogenesis: Accumulation of membranes which are precursors of virus envelopes, *J. Virol.*, **6**, 519—533.
79. Hanafusa H., Hanafusa T., Kamahora J. (1959). Transformation phenomena in the pox group of viruses. II. Transformation between several members of pox group, *Biken J.*, **22**, 85—91.
80. Harper J. M., Parsonage M. T., Pelham H. R., Darby G. (1978). Heat inactivation of vaccinia virus particle-associated functions: Properties of heated particles in vivo and in vitro, *J. Virol.*, **26**, 646—659.
81. Harper L., Bedson H. S., Buchan A. (1979). Identification of orthopoxviruses by polyacrylamide gel electrophoresis of intracellular polypeptides. I. Four major groupings, *Virology*, **93**, 435—444.
82. Hiller G., Jungwirth C., Weber K. (1981). Fluorescence microscopical analysis of the life cycle of vaccinia virus in chick embryo fibroblasts. Virus cytoskeleton interactions, *Exp. Cell Res.*, **132**, 81—87.
83. Holowczak J. H. (1972). Uncoating of poxviruses. I. Detection and characterization of subviral particles in the uncoating process, *Virology*, **50**, 216—232.
84. Hruby D. E., Ball A. L. (1981). Control of expression of the vaccinia virus thymidine kinase gene, *J. Virol.*, **40**, 456—464.
85. Hruby D. E., Ball L. A. (1982). Mapping and identification of the vaccinia virus thymidine kinase gene, *J. Virol.*, **43**, 403—409.
86. Hruby D. E., Lynn D. L., Kates J. R. (1979). Vaccinia virus replication requires active participation of the host cell transcriptional apparatus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1887—1890.
87. Ichihashi Y., Matsumoto S., Dales S. (1971). Biogenesis of poxviruses: Role of A-type inclusions and host cell membranes in virus dissemination, *Virology*, **46**, 507—532.
88. Jeffers E. R., Holowczak J. A. (1971). RNA synthesis in vaccinia-infected L cells. Inhibition of ribosome formation and maturation, *Virology*, **46**, 730—744.
89. Joklik W. K. (1962). Some properties of poxvirus deoxyribonucleic acid, *J. Mol. Biol.*, **5**, 265—274.
90. Joklik W. K. (1964). The intracellular uncoating of poxvirus DNA. I. The fate of radioactively-labeled rabbitpox virus, *J. Mol. Biol.*, **8**, 263—276.
91. Joklik W. K., Becker Y. (1964). The replication and coating of vaccinia DNA, *J. Mol. Biol.*, **10**, 452—474.
92. Jones E. V., Moss B. (1983). Mapping of the vaccinia virus DNA polymerase gene using marker rescue and cellfree translation of selected RNA, *J. Virol.*, **49**, 72—77.
93. Kao S.-V., Ressner E., Kates J., Bauer W. R. (1981). Purification and characterization of a superhelix binding protein from vaccinia virus, *Virology*, **111**, 500—508.
94. Kates J., Beeson J. (1970). Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. II. Synthesis of polyriboadenylic acid, *J. Mol. Biol.*, **50**, 19—23.
95. Kates J. R., McAuslan B. (1967). Messenger RNA synthesis by a «coated» viral genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 314—320.
96. Kates J. R., McAuslan B. R. (1967). Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 134—141.
97. Kato N., Eggers H. J., Rolly H. (1979). Inhibition of release of vaccinia virus by N<sub>1</sub>-isonicotinoyl-N<sub>2</sub>-3-methyl-4-chlorobenzoylhydrazine, *J. Exp. Med.*, **129**, 795—808.

98. Kato S., Kamahora J. (1962). The significance of the inclusion formation of poxvirus group and herpes simplex virus, *Symp. Cell Chem.*, **12**, 47—90.
99. Katz E., Moss B. (1970). Formation of a vaccinia virus structural polypeptide from a higher molecular weight precursor: Inhibition by rifampicin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**, 677—684.
100. Katz E., Margalith E., Winer B. (1973). An isatin- $\beta$ -thiosemi-carbazone (IBI)-dependent mutant of vaccinia virus: The nature of the IBT-dependent step, *J. Gen. Virol.*, **21**, 477—482.
101. Kaverin N. V., Varich N. L., Surgay V. V., Chernos V. I. (1975). A quantitative estimation of poxvirus genome fraction transcribed as early and late mRNA, *Virology*, **65**, 112—119.
102. Kit S., Leong W. C., Trkula D., Jorgenson G. (1974). Gel electrophoresis and isoelectric focusing of mitochondrial and viral induced thymidine kinases, *Int. J. Cancer*, **13**, 203—218.
103. Kleiman J. H., Moss B. (1975). Purification of a protein kinase and two phosphate acceptor proteins from vaccinia virions, *J. Biol. Chem.*, **250**, 2420—2429.
104. Kleiman J. H., Moss B. (1975). Characterization of a protein kinase and two phosphate acceptor proteins from vaccinia virions, *J. Biol. Chem.*, **250**, 2430—2437.
105. LaColla P., Weissbach A. (1975). Vaccinia virus infection of HeLa cells. I. Synthesis of vaccinia DNA in host cell nuclei, *J. Virol.*, **15**, 305—315.
106. Lake J. R., Cooper P. D. (1980). Deletions of the terminal sequences in the genomes of the white pock ( $\mu$ ) and host-restricted (p) mutants of rabbitpox virus, *J. Gen. Virol.*, **48**, 135—147.
107. Lake J. R., Cooper P. D. (1980). Synthesis of virus DNA and polypeptides by temperature-sensitive mutants of rabbitpox virus, *J. Gen. Virol.*, **47**, 243—259.
108. Lambert D., Magee W. E. (1977). Characterization of vaccinia virus DNA in vitro, *Virology*, **79**, 342—354.
109. Lanzer W., Holowczak J. A. (1975). Polyamines in vaccinia virions and polypeptides released from viral cores by acid extraction, *J. Virol.*, **16**, 1254—1264.
110. La Placa M., Portolani M., Mannini-Palenzona A., Barbanti-Bredano G., Bernardini A. (1967). Further studies on the mechanism of the cytopathic changes produced by the molluscum contagiosum virus into human amnion cell cultures, *G. Microbiol.*, **15**, 205—216.
111. Lyles D. S., Randall C. C., Gafford L. G., White H. B., Jr. (1976). Cellular fatty acids during fowlpox virus infection of three different host systems, *Virology*, **70**, 227—229.
112. Mackett M., Archard L. C. (1979). Conservation and variation in orthopoxvirus genome structure, *J. Gen. Virol.*, **45**, 683—701.
113. Mackett M., Smith G. L., Moss B. (1982). Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**, 7415—7419.
114. Martin S. A., Moss B. (1975). Modification of RNA by mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7)-methyltransferase from vaccinia virions, *J. Biol. Chem.*, **250**, 9330—9335.
115. Martin S. A., Moss B. (1976). mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7)-methyltransferase from vaccinia virions. Donor and acceptor substrate activities, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7313—7321.
116. Martin S. A., Paoletti E., Moss B. (1975). Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7)-methyltransferase from vaccinia virus, *J. Biol. Chem.*, **250**, 9322—9329.
117. Matthews R. E. F. (1982). Classification and nomenclature of viruses, *Inter-virology*, **17**, 42—46.

118. *Mbuy G. N., Morris R. E., Bubel H. C.* (1982). Inhibition of cellular protein synthesis by vaccinia virus surface tubules, *Virology*, **116**, 137—147.
119. *McAuslan B. R.* (1963). Control of induced thymidine kinase activity in the poxvirus infected cell, *Virology*, **20**, 162—168.
120. *McAuslan B. R.* (1963). The induction and repression of thymidine kinase in the poxvirus-infected HeLa cell, *Virology*, **21**, 383—389.
121. *McAuslan B. R., Kates J. R.* (1967). Poxvirus induced acid deoxyribonuclease: Regulation of synthesis; control of activity in vivo; purification and properties of the enzyme, *Virology*, **33**, 709—716.
122. *McFadden G., Dales S.* (1979). Biogenesis of poxviruses: Mirror image deletions in vaccinia virus DNA, *Cell*, **18**, 101—108.
123. *Menna A., Wittek R., Bachman P. A., Mayr A., Wyler R.* (1979). Physical characterization of 2 stomatitis papulosa virus genomes: A cleavage map for the restriction endonucleases HindIII and EcoRI, *Arch. Virol.*, **59**, 145—156.
124. *Milo G. E., Jr., Yohn D. A.* (1975). Alterations of enzymes associated with plasma membranes and cellular organelles during infection of CV-1 cells with Yaba tumor poxvirus, *Cancer Res.*, **35**, 199—206.
125. *Morgan C.* (1976). The insertion of DNA into vaccinia virus, *Science*, **193**, 591—592.
126. *Morgan C.* (1976). Vaccinia virus reexamined: Development and release, *Virology*, **73**, 43—58.
127. *Moss B.* (1968). Inhibition of HeLa cell protein synthesis by the vaccinia virion, *J. Virol.*, **2**, 1028—1037.
128. *Moss B., Cooper N.* (1982). Genetic evidence for vaccinia virus-encoded DNA polymerase: Isolation of phosphonoacetate-resistant enzyme from the cytoplasm of cells infected with mutant virus, *J. Virol.*, **43**, 673—678.
129. *Moss B., Filler R.* (1970). Irreversible effects of cycloheximide during the early period of vaccinia virus replication, *J. Virol.*, **5**, 99—108.
130. *Moss B., Rosenblum E. N.* (1973). Protein cleavage and poxvirus morphogenesis: Tryptic peptide analysis of core precursors accumulated by blocking assembly with rifampicin, *J. Mol. Biol.*, **81**, 267—269.
131. *Moss B., Salzman N. P.* (1968). Sequential protein synthesis following vaccinia virus infection, *J. Virol.*, **2**, 1016—1027.
132. *Moss B., Rosenblum E. N., Garon C. F.* (1971). Glycoprotein synthesis in cells infected with vaccinia virus. I. Non-virion glycoproteins, *Virology*, **46**, 221—232.
133. *Moss B., Rosenblum E. N., Garon C. F.* (1973). Glycoprotein synthesis in cells infected with vaccinia virus. III. Purification and biosynthesis of the virion glycoprotein, *Virology*, **55**, 143—156.
134. *Moss B., Rosenblum E. N., Gershowitz A.* (1975). Characterization of a polyrriboadenylate polymerase from vaccinia virions, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4722—4729.
135. *Moss B., Smith G. L., Mackett M.* (1983). Use of vaccinia virus as an infectious molecular cloning and expression vector. In: *Gene Amplification and Analysis*, Vol. 3, ed. by M. Rosenberg, T. Papas, and J. G. Chirikjian, pp. 201—214, Elsevier/North-Holland, New York.
136. *Moss B., Winters E., Cooper J. A.* (1981). Deletion of a 9,000 base pair segment of the vaccinia virus genome that encoded non-essential polypeptides, *J. Virol.*, **40**, 387—395.
137. *Moss B., Winters E., Jones E. V.* (1983). Replication of vaccinia virus: In: *Proceedings of the 1983 UCLA Symposium, Mechanics of DNA Replication and Recombination*, ed. by N. Cozzarelli, pp. 449—461, A. Liss, New York.
138. *Moss B., Rosenblum E. N., Katz E., Grimley P. M.* (1969). Rifampicin: A specific inhibitor of vaccinia virus assembly, *Nature*, **224**, 1280—1284.



139. Moyer R. W., Graves R. L. (1981). The mechanism of cytoplasmic orthopoxvirus DNA replication, *Cell*, **27**, 391—401.
140. Moyer R. W., Graves R. L. (1982). IV. The late white pock ( $\mu$ ) host range (hr) mutants of rabbit poxvirus are blocked in morphogenesis, *Virology*, **119**, 332—346.
141. Moyer R. W., Rothe C. T. (1980). The white pock mutants of rabbit poxvirus. I. Spontaneous host range mutants contain deletions, *Virology*, **102**, 119—132.
142. Moyer R. W., Brown G. D., Graves R. L. (1980). The white pock mutants of rabbit poxvirus. II. The early white pock ( $\mu$ ) host range (hr) mutants of rabbit poxvirus uncouple transcription and translation in nonpermissive cells, *Virology*, **106**, 234—249.
143. Moyer R. W., Graves R. L., Rothe C. T. (1980). The white pock ( $\mu$ ) mutants of rabbit poxvirus. III. The terminal DNA sequence duplication and transposition in rabbit poxvirus, *Cell*, **22**, 545—553.
144. Munyon W. E., Paoletti E., Grace J. T., Jr. (1967). RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 2280—2288.
145. Muthukrishnan S., Moss B., Cooper J. A., Maxwell E. S. (1978). Influence of 5' terminal cap structure on the initiation of translation of vaccinia virus mRNA, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1710—1715.
146. Nagayama A., Pogo B. G. T., Dales S. (1970). Biogenesis of vaccinia: Separation of early stages from maturation by means of rifampicin, *Virology*, **40**, 1039—1051.
147. Nakano E., Panicali D., Paoletti E. (1982). Molecular genetics of vaccinia virus: Demonstration of marker rescue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1593—1596.
148. Nevins J. R., Joklik W. K. (1977). Isolation and properties of the vaccinia virus-DNA-dependent RNA polymerase, *J. Biol. Chem.*, **252**, 6930—6938.
149. Oda K., Joklik W. K. (1967). Hybridization and sedimentation studies on «early» and «late» vaccinia messenger RNA, *J. Mol. Biol.*, **27**, 395—419.
150. Oie M., Ichihashi Y. (1981). Characterization of vaccinia polypeptides, *Virology*, **113**, 263—276.
151. Olgiati D., Pogo B. G. T., Dales S. (1976). Biogenesis of vaccinia: Specific inhibition of rapidly labeled host DNA in vaccinia inoculated cells, *Virology*, **71**, 325—335.
152. Ortin J., Enjuanes L., Vinuela E. (1979). Cross-links in African swine fever virus DNA, *J. Virol.*, **31**, 579—583.
153. Padgett B. L., Tompkins J. K. N. (1968). Conditional lethal mutants of rabbitpox virus. III. Temperature-sensitive (ts) mutants; physiological properties, complementation and recombination, *Virology*, **36**, 161—167.
154. Panicali D., Paoletti E. (1982). Construction of poxviruses as cloning vectors: Insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4927—4931.
155. Panicali D., Davis S. W., Mercer S. R., Paoletti E. (1981). Two major DNA variants present in serially propagated stocks of the WR strain of vaccinia virus, *J. Virol.*, **37**, 1000—1010.
156. Paoletti E., Grady L. J. (1977). Transcriptional complexity of vaccinia virus in vivo and in vitro, **23**, 608—615.
157. Paoletti E., Lipinskas B. R. (1978). Soluble endoribonuclease activity from vaccinia virus-specific cleavage of virion-associated high-molecular-weight RNA, *J. Virol.*, **26**, 822—824.
158. Paoletti E., Lipinskas B. R. (1978). The role of ATP in the biogenesis of vaccinia virus mRNA in vitro, *Virology*, **87**, 317—325.
159. Paoletti E., Moss B. (1974). Two nucleic acid-dependent nucleoside triphos-

- phate phosphohydrolases from vaccinia virus. Nucleotide substrate and polynucleotide cofactor specificities, *J. Biol. Chem.*, **249**, 3281—3286.
160. *Paoletti E., Cooper N., Moss B.* (1974). Regulation of synthesis of two immunologically distinct nuclei acid-dependent nucleoside triphosphate phosphohydrolases in vaccinia virus-infected HeLa cells, *J. Virol.*, **14**, 578—586.
  161. *Paoletti E., Rosenmond-Hornbeak H., Moss B.* (1974). Two nuclei acid-dependent nucleoside triphosphate phosphohydrolases from vaccinia virus: Purification and characterization, *J. Biol. Chem.*, **249**, 3273—3280.
  162. *Payne L.* (1978). Polypeptide composition of extracellular enveloped vaccinia virus, *J. Virol.*, **27**, 28—37.
  163. *Payne L. G.* (1979). Identification of the vaccinia hemagglutinin polypeptide from a cell system yielding large amounts of extracellular enveloped virus, *J. Virol.*, **31**, 147—155.
  164. *Payne L. G.* (1980). Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia, *J. Gen. Virol.*, **50**, 89—100.
  165. *Payne L. G., Kristenson K.* (1979). Mechanism of vaccinia virus release and its specific inhibition by  $N_1$ -isonicotinoyl- $N_2$ -3-methyl-4-chlorobenzoylhydrazine, *J. Virol.*, **32**, 614—622.
  166. *Payne L. G., Kristenson K.* (1982). Effect of glycosylation inhibitors on the release of enveloped vaccinia virus, *J. Virol.*, **41**, 367—375.
  167. *Payne L. G., Norrby E.* (1978). Adsorption and penetration of enveloped and naked vaccinia virus particles, *J. Virol.*, **27**, 19—27.
  168. *Pedrali-Noy G., Weisbach A.* (1977). Evidence of a repetitive sequence in vaccinia virus DNA, *J. Virol.*, **24**, 406—407.
  169. *Pelham H. R. B.* (1977). Use of coupled transcription and translation to study mRNA production by vaccinia cores, *Nature*, **269**, 532—534.
  170. *Pennington T. H.* (1974). Vaccinia virus polypeptide synthesis: Sequential appearance and stability of pre- and post-replicative polypeptides, *J. Gen. Virol.*, **25**, 433—444.
  171. *Pennington T. H., Follett E. A.* (1974). Vaccinia virus replication in endonuclease BSC-1 cells: Particle production and synthesis of viral DNA and proteins, *J. Virol.*, **13**, 488—493.
  172. *Person A., Ben-Hamida F., Beaud G.* (1980). Inhibition of 40S Met-tRNA<sup>Met</sup> ribosomal initiation complex formation by vaccinia virus, *Nature*, **287**, 355—357.
  173. *Pickup D. J., Bastia D., Joklik W. K.* (1983). Cloning of the terminal loop of vaccinia virus DNA, *Virology*, **124**, 215—217.
  174. *Pickup D. J., Bastia D., Stone H. O., Joklik W. K.* (1982). Sequence of terminal regions of cowpoxvirus DNA: Arrangement of repeated and unique sequence elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7112—7116.
  175. *Pogo B. G. T.* (1980). Changes in parental vaccinia virus DNA after viral penetration into cells, *Virology*, **101**, 520—524.
  176. *Pogo B. G. T.* (1980). Terminal cross-linking of vaccinia DNA strands by an in vitro system, *Virology*, **100**, 339—347.
  177. *Pogo B. G. T., Dales S.* (1969). Regulation of the synthesis of nucleotide phosphohydrolase and neutral deoxyribonuclease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 1297—1303.
  178. *Pogo B. G. T., Dales S.* (1969). Two deoxyribonuclease activities within purified vaccinia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 820—827.
  179. *Pogo B. G. T., O'Shea M. T.* (1977). Further characterization of deoxyribonucleases from vaccinia virus, *Virology*, **77**, 55—66.
  180. *Pogo B. G. T., O'Shea M. T.* (1978). The mode of replication of vaccinia virus DNA, *Virology*, **86**, 1—8.

181. Pogo B. G. T., O'Shea M., Freimuth P. (1981). Initiation and termination of vaccinia virus DNA replication, *Virology*, **108**, 241—248.
182. Prescott D. M., Kates J., Kirkpatrick J. B. (1971). Replication of vaccinia virus DNA in enucleated L-cells, *J. Mol. Biol.*, **59**, 505—508.
- 183a. Pritchard A. E., Cummings D. J. (1981). Replication of linear mitochondrial DNA from paramecium: Sequence and structure of the initiation crosslink, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7341—7345.
- 183b. Raczynski P., Condit R. C. (1983). Specific inhibition of vaccinia virus growth by 2'-O-methyladenosine: Isolation of a drug-resistant virus mutant, *Virology*, **128**, 458—462.
- 183c. Rice A. P., Roberts B. E. (1983). Vaccinia virus induces cellular mRNA degradation, *J. Virol.*, **47**, 529—539.
184. Roening G., Holowczak J. A. (1974). Evidence for the presence of RNA in the purified virions of vaccinia virus, *J. Virol.*, **14**, 704—708.
185. Rosenmond H., Moss B. (1973). Phosphoprotein component of vaccinia virions, *J. Virol.*, **11**, 961—970.
186. Rosemond-Hornbeak H., Moss B. (1974). Single-stranded deoxyribonucleic acid-specific nuclease from vaccinia virus. Endonucleolytic and exonucleolytic activities, *J. Biol. Chem.*, **249**, 3292—3296.
187. Rosenmond-Hornbeak H., Paoletti E., Moss B. (1974). Single-stranded deoxyribonucleic acid-specific nuclease from vaccinia virus. Purification and characterization, *J. Biol. Chem.*, **249**, 3287—3291.
188. Rouhandeh H., Vafai A. (1982). A novel cell transformation with DNA-containing cytoplasmic Yaba tumor poxvirus, *Virology*, **20**, 77—92.
189. Salzman N. P. (1960). The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus, *Virology*, **10**, 150—152.
- 190a. Salzman N. P., Sebring E. (1967). Sequential formation of vaccinia virus proteins and viral deoxyribonucleic acid, *J. Virol.*, **1**, 16—23.
- 190b. Salzman N. P., Shatkin A. J., Sebring E. D. (1964). The synthesis of a DNA-like RNA in the cytoplasm of HeLa cells infected with vaccinia virus, *J. Mol. Biol.*, **8**, 405—416.
191. Cam C. K., Dumbell K. R. (1981). Expression of poxvirus DNA in coinfecting cells and marker rescue of thermosensitive mutants by subgenomic fragments of DNA, *Ann. Virol.*, **132E**, 135—150.
192. Sambrook J., Shatkin A. J. (1969). Polynucleotide ligase activity in cells infected with simian virus 40, polyoma virus or vaccinia virus, *J. Virol.*, **4**, 719—726.
193. Sarov I., Joklik W. K. (1972). Studies on the nature and location of the capsid polypeptides of vaccinia virions, *Virology*, **50**, 579—592.
194. Sarov I., Joklik W. K. (1972). Characterization of intermediates in the uncoating of vaccinia virus DNA, *Virology*, **50**, 593—602.
195. Sarov I., Joklik W. K. (1973). Isolation and characterization of intermediates in vaccinia virus morphogenesis, *Virology*, **52**, 223—233.
196. Sebring E. D., Salzman N. P. (1967). Metabolic properties of early and late vaccinia messenger ribonucleic acid, *J. Virol.*, **1**, 550—575.
197. Shida H., Dales S. (1981). Biogenesis of vaccinia: Carbohydrate of the hemagglutinin molecules, *Virology*, **111**, 56—72.
198. Shope R. E. (1932). A filtrable virus causing a tumor-like condition in rabbits and its relationship to virus myxomatosis, *J. Exp. Med.*, **56**, 803—822.
199. Shuman S., Hurwitz J. (1981). Mechanism of mRNA capping by vaccinia virus guanylyltransferase: Characterization of an enzyme-guanylate intermediate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 187—191.
200. Shuman S., Surks M., Furneaux H., Hurwitz J. (1980). Purification and characterization of a GTP-pyrophosphate exchange activity from vaccinia virions, Association of the GTP-pyrophosphate exchange activity with vacci-



- nia mRNA guanylyltransferase·RNA (guanine-7-)-methyltransferase complex capping enzyme, *J. Biol. Chem.*, **255**, 11588—11598.
201. *Silver M., Dales S.* (1982). Biogenesis of vaccinia: Interrelationship between post-translational cleavage, virus assembly and maturation, *Virology*, **117**, 341—356.
  202. *Silver M., McFadden G., Wilton S., Dales S.* (1979). Biogenesis of poxviruses: Role for the DNA dependent RNA polymerase II of the host during expression of late function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4122—4125.
  203. *Smadel J. E., Hoagland C. L.* (1942). Elementary bodies of vaccinia, *Bacteriol. Rev.*, **6**, 79—110.
  204. *Smadel J. E., Rivers T. M., Pickels E. G.* (1939). Estimation of the purity of preparation of elementary bodies of vaccinia, *J. Exp. Med.*, **70**, 379—385.
  205. *Smith G. L., Moss B.* (1983). Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25,000 base pairs of foreign DNA, *Gene*, **25**, 21—28.
  206. *Smith G. L., Mackett M., Moss B.* (1983). Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen, *Nature*, **302**, 490—495.
  207. *Smith G. L., Murphy B. R., Moss B.* (1983). Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induced resistance to influenza virus infection in hamsters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7155—7159.
  208. *Soloski M. J., Holowczak J. A.* (1981). Characterization of supercoiled nucleoprotein complexes released from detergent-treated vaccinia virions, *J. Virol.*, **37**, 770—783.
  209. *Spadari S.* (1976). Properties of DNA ligase from uninfected and virus-infected HeLa cells, *Nucleic Acids Res.*, **3**, 2155—2167.
  210. *Spencer E., Shuman S., Hurwitz J.* (1980). Purification and properties of vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase, *J. Biol. Chem.*, **255**, 5388—5395.
  211. *Spencer E., Loring D., Hurwitz J., Monroy G.* (1978). Enzymatic conversion of 5'-phosphate terminated RNA to 5'-di and triphosphate-terminated RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4793—4797.
  212. *Stern W., Dales S.* (1974). Biogenesis of vaccinia: Concerning the origin of the envelope phospholipids, *Virology*, **62**, 293—306.
  213. *Stern W., Dales S.* (1976). Biogenesis of vaccinia. Isolation and characterization of a surface component that elicits antibody suppressing infectivity and cell-cell fusion, *Virology*, **75**, 232—241.
  214. *Stern W., Dales S.* (1976). Biogenesis of vaccinia: Relationship of the envelope to virus assembly, *Virology*, **75**, 242—255.
  215. *Stokes G. V.* (1976). High-voltage electron microscope study of the release of vaccinia virus from whole cells, *J. Virol.*, **18**, 636—642.
  216. *Straus S. E., Sebring E. D., Rose J. A.* (1976). Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 742—746.
  217. *Subak-Sharpe T. H., Timbury M. C., Williams J. F.* (1969). Rifampicin inhibits the growth of some mammalian viruses, *Nature (Lond.)*, **222**, 341—345.
  218. *Szostak J. W., Blackburn E. H.* (1982). Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors, *Cell*, **29**, 245—255.
  219. *Takahashi M., Kameyama S., Kato S., Kamahora J.* (1959). The immunological relationship of the poxvirus group, *Biken. J.*, **2**, 27—29.
  220. *Tattersall P., Ward D. C.* (1976). Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA, *Nature*, **263**, 106—109.
  221. *Tompkins W. A. F., Walker D. L., Hinze H. C.* (1969). Cellular deoxyribonucleic acid synthesis and loss of contact inhibition in irradiated and con-

- tact-inhibited cell cultures infected with fibroma virus, *J. Virol.*, **4**, 603—609.
222. *Tutas D. J., Paoletti E.* (1977). Purification and characterization of core-associated polynucleotide 5'-triphosphatase from vaccinia virus, *J. Biol. Chem.*, **252**, 3092—3098.
  223. *Varich N. L., Sychova I. V., Kaverin N. V., Antonova T. P., Chernos V. T.* (1979). Transcription of both DNA strands of vaccinia virus genome in vivo, *Virology*, **96**, 412—430.
  224. *Vassef A., Ben-Hamida F., Dru A., Beaud G.* (1982). Translational control of early protein synthesis at the late stage of vaccinia virus infection, *Virology*, **118**, 45—53.
  225. *Venkatesan S., Baroudy B. M., Moss B.* (1981). Distinctive nucleotide sequences adjacent to multiple initiation and termination sites of an early vaccinia virus gene, *Cell*, **125**, 805—813.
  226. *Venkatesan S., Gershowitz A., Moss B.* (1980). Modification of the 5'-end of mRNA: Association of RNA triphosphatase with the RNA guanylyltransferase-RNA (guanine-7)-methyltransferase complex from vaccinia virus, *J. Biol. Chem.*, **255**, 903—908.
  227. *Venkatesan S., Gershowitz A., Moss B.* (1982). Complete nucleotide sequences of two adjacent early vaccinia virus genes location within the inverted terminal repetition, *J. Virol.*, **44**, 637—646.
  228. *Vreeswijk J., Kalsbeck G. L., Nanninga N.* (1977). Envelope and nucleoid ultrastructure of molluscum contagiosum virus, *Virology*, **83**, 120—127.
  229. *Vreeswijk J., Leene W., Kalsbeck G. L.* (1977). Early host cell molluscum contagiosum virus interactions. II. Viral interactions with the basal epidermal cells, *J. Invest. Dermatol.*, **69**, 249—256.
  230. *Wei C. M., Moss B.* (1975). Methylated nucleotides block 5'-terminus of vaccinia virus mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 318—322.
  231. *Weir J. P., Moss B.* (1983). Nucleotide sequence of the vaccinia virus thymidine kinase gene and the nature of spontaneous frameshift mutations, *J. Virol.*, **46**, 530—537.
  232. *Weir J. P., Bajszar G., Moss B.* (1982). Mapping of the vaccinia virus thymidine kinase gene by marker rescue and by cell-free translation of selected mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1210—1214.
  233. *Williamson J. D., Cooke B. C.* (1973). Arginosuccinate synthetase-lyase activity in vaccinia virus-infected HeLa and mouse cells, *J. Gen. Virol.*, **21**, 349—357.
  234. *Wittek R., Moss B.* (1980). Tandem repeats within the inverted terminal repetition of vaccinia virus DNA, *Cell*, **21**, 277—284.
  235. *Wittek R., Kuenzle C. C., Wyler R.* (1979). High C+G content in parapoxvirus DNA, *J. Gen. Virol.*, **43**, 231—234.
  236. *Wittek R., Menna A., Muller K., Schumperli D., Bosley P. G., Wyler R.* (1978). Inverted terminal repeats in rabbits poxvirus and vaccinia virus DNA, *J. Virol.*, **28**, 171—181.
  237. *Wittek R., Menna A., Schumperli D., Stoffel S., Muller H. K., Wyler R.* (1977). HindIII and SstI restriction sites mapped on rabbit poxvirus and vaccinia virus DNA, *J. Virol.*, **23**, 669—678.
  238. *Woodroffe G. M., Fenner F.* (1962). Serological relationships within the poxvirus group: An antigen common to all members of the group, *Virology*, **16**, 334—341.
  239. *Woodson B.* (1967). Vaccinia mRNA synthesis under conditions which prevent uncoating, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 169—175.
  240. *Zwartouw H. T.* (1964). The chemical composition of vaccinia virus, *J. Gen. Microbiol.*, **34**, 115—123.

## Вирус гепатита В

У. С. Робинсон<sup>1</sup>

Вирус гепатита В (HBV) распространен по всему миру. Он имеет большое значение для медицины, так как, видимо, является самым распространенным виновником хронических заболеваний печени, в том числе гепатоцеллюлярной карциномы у человека [214]. Кроме того, этот вирус и три близко родственных ему вируса, найденные у животных, стоящих на более низкой ступени эволюционного развития — сурков [213], земляных белок [123] и пекинских уток [127], — обладают молекулярными и биологическими особенностями, которые отличают их от всех ранее известных групп вирусов. Вирус гепатита сурков (WHV, от англ. woodchuck hepatitis virus) открыт [213] в 1978 г. в колонии *Marmota monax* в Филадельфийском зоопарке. Вирус обычно обнаруживали в сыворотке животных с гепатитом и гепатоцеллюлярной карциномой. Вирус гепатита земляной белки (GSHV, от англ. ground squirrel hepatitis virus) открыт [122] в 1980 г. в сыворотке диких *Spermophilus beecheyi*, пойманных в Северной Калифорнии. Вирус гепатита уток (DHV) первоначально был выявлен (Summers, London, Sun, Blumberg, неопубликованные данные) в сыворотке домашних уток в одном из регионов Китайской Народной Республики, где у этих птиц обычно встречается гепатоцеллюлярная карцинома [243]. Эти вирусы входят в новую группу, которая названа группой гепаднавирусов [121, 178, 183].

В связи с тем что эти вирусы были идентифицированы относительно недавно и их еще не удастся размножить в культуре ткани, неизвестны еще многие детали, касающиеся механизма их репликации. И вместе с тем уже сейчас ясно, что эти вирусы обладают рядом уникальных свойств. К одной из наиболее характерных особенностей относится структура их ДНК. В состав вирионов входят небольшие кольцевые молекулы ДНК [182], которые частично являются одноцепочечными, а также ДНК-полимераза [97, 179], которая может достраивать ДНК и делать ее полностью двухцепочечной [89, 107, 212]. Имеющаяся информация

---

<sup>1</sup> W. S. Robinson, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Stanford University Medical Center, Stanford, California 94305.



позволяет также предположить, что механизм репликации вирусной ДНК уникален и что в нем участвует промежуточная РНК [133, 210]. К биологическим особенностям вируса гепатита относится его паразитическое сродство к гепатоцитам и способность часто вызывать персистентную инфекцию при высокой концентрации вирусного антигена и инфекционного вируса в крови: в более низких концентрациях вирус определяется и в других жидкостях организма. Такой характер инфекции объясняет передачу HBV при парентеральном введении сыворотки и содержащих сыворотку препаратов. Распространенность и длительность персистентной инфекции HBV позволяет этому вирусу сохраняться в значительно меньших изолированных группах населения, чем это необходимо, например, для поддержания вируса гепатита А [128] или вируса кори [18], которые не вызывают персистентных инфекций.

#### **ОБНАРУЖЕНИЕ И ПРИРОДА ФОРМ ВИРУСА, ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ В КРОВИ**

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) открыт в 1963 г. [8, 19] при исследовании полиморфизма сывороточных белков человека. Несколько лет исследований привели к тому, что его окончательно связали с острым гепатитом В [20, 158, 165], и он был назван гепатит-ассоциированным антигеном (НАА). Позже, в связи с тем что он представляет собой поверхностный или оболочечный белок вириона гепатита В, он получил вошедшее сейчас в употребление название «поверхностный антиген вируса гепатита В» (HBsAg, от англ. hepatitis B surface antigen). Он является наиболее удобным маркером активной инфекции HBV. HBsAg присутствует в крови либо как составная часть вириона, либо как неполный корпускулярный вирусный компонент; никаких истинно растворимых или низкомолекулярных форм его не обнаружено [15, 111]. Поскольку вирус гепатита В не растет в культуре ткани, основным источником вирусного материала для его изучения служит сыворотка больных.

Первыми корпускулярными формами HBsAg, которые Бэйер и др. [15] в 1968 г. наблюдали с помощью электронного микроскопа, были небольшие сферические частицы, гетерогенные по размерам и внешнему виду [диаметром от 16 до 25 нм, названные (22 нм)-частицами], а также нитевидные и палочкообразные частицы (имеющие 22 нм в ширину и до нескольких сот нанометров в длину) (рис. 31.1). Это наиболее многочисленные несущие HBsAg частицы в сыворотке большинства больных, зараженных HBV. Они состоят из белка, углеводов и липидов, не содержат ДНК и сейчас рассматриваются как неполная форма оболочечного белка вируса. В 1970 г. Дейн и др. [46] описали большую,

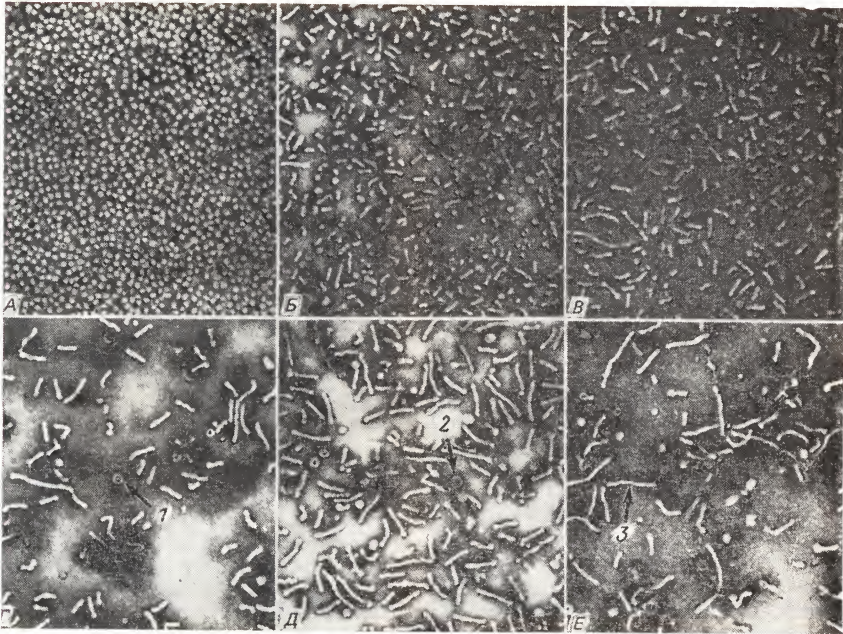


Рис. 31.1. Электронные микрофотографии форм HBV в крови больных. А—Е. Фракции градиента плотности сахарозы после скоростного зонального осаждения частиц. 1 — вирионы с электроплотной сердцевинкой; 2 — пустые вирионы; 3 — нитевидные формы.

более сложную частицу, содержащую HBsAg. Достоверные данные свидетельствуют о том, что «частица Дейна» представляет собой полный вирион гепатита В. Вирион диаметром 42 нм имеет липидсодержащий наружный слой (оболочку) толщиной 7 нм и электроплотную сферическую внутреннюю сердцевину, или нуклеокапсид, диаметром 28 нм (рис. 31.2, А). Поверхность вириона имеет антигенные детерминанты HBsAg, общие с неполными формами вируса [шаровидными и нитевидными (22 нм)-частицами] [6, 46]. Наружная оболочка вириона удаляется обработкой неионными детергентами, такими, как NP-40, после чего остаются свободные сердцевинные частицы (рис. 31.2, Б), которые содержат вирус-специфический антиген сердцевинки гепатита В (HBcAg, от англ. hepatitis B core antigen), антигенно отличающийся от HBsAg [180]. Сердцевина вируса содержит также вирусную ДНК [8] с ковалентно присоединенным полипептидом [70], ДНК-полимеразу [97, 179], протеинкиназу [1] и, вероятно, третий антиген, ассоциированный с инфекционностью HBV (HBeAg, от англ. hepatitis B e antigen), присутствующий в скры-



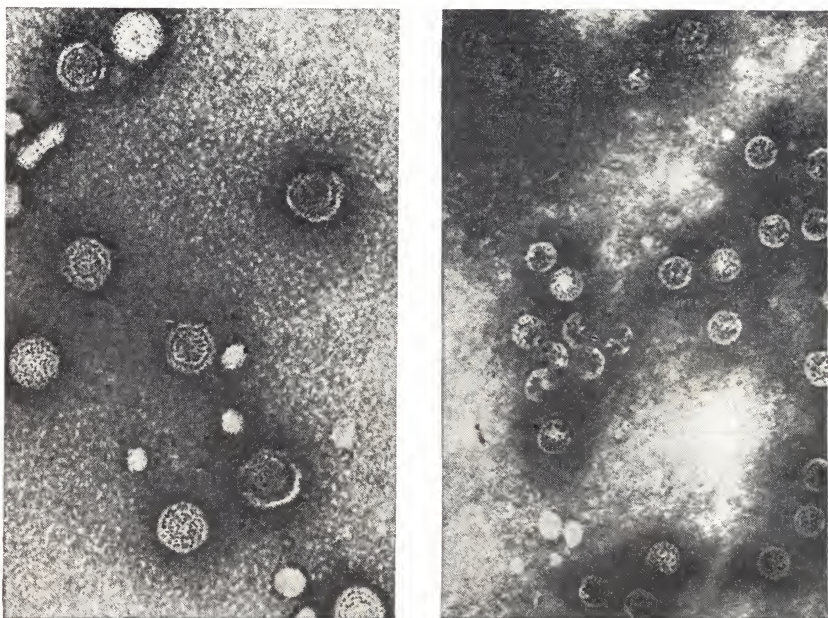


Рис. 31.2. Электронные микрофотографии вирионов (слева) и сердцевин после обработки вирионов детергентом NP-40 (справа) (эксперимент Дж. Алмейды).

той форме [218]. Эти вопросы подробно обсуждаются в следующих разделах и иллюстрируются рис. 31.3. Кроме вирионов с электроплотной сердцевиной во всех препаратах обнаружены также вирионы с пустой сердцевиной (рис. 31.1). При изучении эволюции вирусного гепатита В у людей [105] можно видеть, как различные серологические маркеры взаимодействуют друг с другом.

Размер вириона гепатита В, установленный с помощью электронного микроскопа, составляет 42 нм в диаметре, что совпадает с результатами ранних исследований с применением ультрафильтрации, в которых было показано, что инфекционный агент проходит через фильтры Зейца со средним диаметром пор 52 нм [130]. Измеренная с помощью электронного микроскопа концентрация физических частиц вирионов в сыворотке (неопределяемая в одних сыворотках и достигающая в других  $10^5$ — $10^9$  вирионов на 1 мл) [4] коррелирует с концентрацией HBV, непосредственно измеренной по инфекционности [12, 14, 84, 190, 201]. Введение шимпанзе 1 мл некоторых неразведенных HBsAg-реактивных сывороток, полученных от больных хроническим гепатитом В после противовирусной терапии, не вызывало у них инфекции [190].



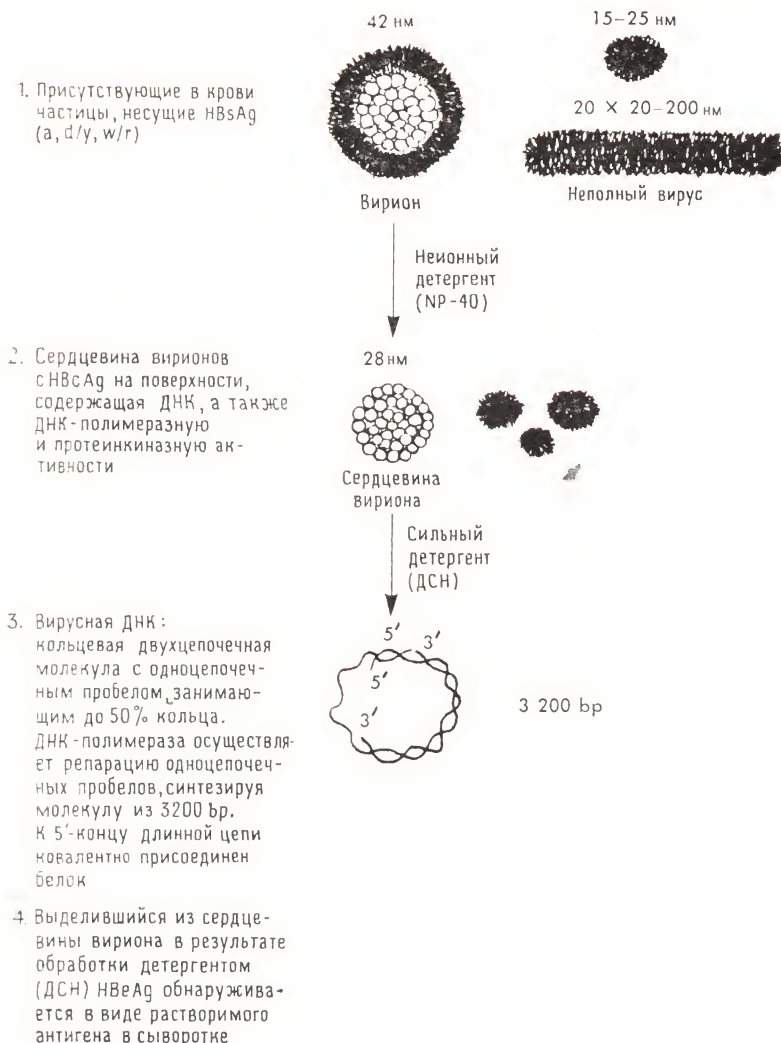


Рис. 31.3. Формы HBV, присутствующие в крови инфицированных больных.

Это позволяет предположить, что у таких больных HBsAg циркулирует только в составе неполных частиц, но не в составе полных вирионов. Вместе с тем сыворотками некоторых больных удавалось заражать людей или шимпанзе в разведениях до  $10^{-7}$  [12] или до  $10^{-8}$  [190, 201], что указывает на наличие в них высоких концентраций вирионов. Однако непосредственного сравнения тщательно измеренной концентрации физических частиц вируса

с количественным инфекционным титром HBV з одних и тех же сыворотках не проводили. Показано, что с помощью процедур концентрирования и частичной очистки вирионов можно получить препараты, инфекционные в более высоких разведениях ( $10^{-10}$ ), чем неконцентрированная сыворотка [226].

Содержание неполных вирусных форм в сыворотке обычно значительно превышает концентрацию полных вирионов. В некоторых сыворотках обнаружено  $10^{13}$  и более сферических (22 нм)-частиц в 1 мл [101], т. е. их число превышает число вирионов в 10 000 и более раз.

В крови животных, зараженных WHV, GSHV и DHV, найден набор вирусных форм, аналогичных описанным выше для HBV. Размер полных вирионов WHV [213] и GSHV [123], по всей вероятности, несколько больше (47 нм в диаметре), чем вирионов гепатита В, а вирионы DHV отличаются большей полиморфностью.

HBV сохраняет инфекционность для людей в сыворотке по крайней мере в течение 6 мес при 30—32°C [171] и в течение 15 лет при —20°C. После высушивания вирус сохраняет жизнеспособность при хранении при 25°C по крайней мере в течение 1 нед [22]. При процедуре фракционирования плазмы по Кону большая часть HBV, HBsAg и ДНК-полимеразы сохраняется во фракции I (фибриноген, фактор VIII) или во фракции III (протромбиновый комплекс), тогда как ббльшая часть HBsAg перемещается во фракцию IV (фракция плазматических белков), а меньшие количества — во фракции III и V (альбумин) [17, 86, 188, 229]. После прогревания HBV до 60°C в течение 4 ч он еще сохраняет инфекционность [141]. 10-часовое прогревание сывороточного альбумина при 60°C при обычных условиях приводит к инаktivации инфекционного вируса [66]. Однако при очень высокой концентрации HBV инаktivация может быть неполной [200, 204]. При 98°C инфекционность сыворотки частично устраняется через 1 мин [103] или полностью — через 20 мин [241]. Обработка сухим жаром при 160°C разрушает инфекционность в течение 1 ч [185]. При pH 2,4 HBsAg стабилен в течение 6 ч, но инфекционность HBV при этом теряется. В другой серии опытов HBV в течение 10 мин обрабатывали при 20°C одним из пяти дезинфицирующих препаратов (гипохлоритом натрия +500 мг свободного активного хлора на 1 л; Cidex CX-250+2%-ный водный раствор глутаральдегида, pH 8,4; Sporidicin pH 7,9+0,12%-ный глутаральдегид и 0,44%-ный фенол; 70%-ным изопропиловым спиртом; Wescodine, разведенным 1:213 и содержащим 80 мг активного иода на 1 л) и затем вводили одному шимпанзе [21]. Ни у одного из пяти животных не было отмечено признаков заболевания. Наконец сообщалось, что обработка  $\beta$ -пропиолактоном

в комбинации с ультрафиолетовым облучением уменьшает титр инфекционного HBV в плазме человека примерно в 10 млн. раз [167].

#### СТРУКТУРА ПОВЕРХНОСТНОГО ВИРУСНОГО АНТИГЕНА

Поверхностный антиген HBV — сложный антигенный комплекс. В HBsAg-частицах может быть определено по крайней мере 5 антигенных детерминант. Группоспецифическая детерминанта, обозначаемая *a*, является общей для всех препаратов HBsAg. Кроме того, имеются две пары подтиповых детерминант: *d* или *y* и *w* или *r*, которые по большей части взаимоисключают друг друга и поэтому обычно ведут себя как аллели [11, 109]. Описаны антигенная гетерогенность *w*-детерминант и добавочные детерминанты, такие, как *q* или *x* или *g* [43, 45]. Идентифицировано 8 подтипов HBsAg: *ayw*<sub>1</sub>, *ayw*<sub>2</sub>, *ayw*<sub>3</sub>, *ayw*<sub>4</sub>, *ayr*, *adw*<sub>2</sub>, *adw*<sub>4</sub> и *adr* [43]. Встречаются сообщения о выделении на Дальнем Востоке, правда в единичных случаях, необычных комбинаций подтипов детерминант HBsAg (например, *awr*, *adwr*, *adyw*, *adyr* и *adywr*) [43]. В этих случаях детерминанты подтипов найдены на одних и тех же частицах, что позволяет предположить фенотипическое смешивание или образование необычных генетических рекомбинантов во время смешанной инфекции. Наблюдается неравномерное географическое распределение подтипов HBsAg среди зараженного населения [10, 129]. В Северной Америке, Европе и Африке преобладают подтипы *adw* и *ayw*, а в Юго-Восточной Азии и на Дальнем Востоке — подтип *adr* наряду с *adw* и *ayw*. Подтип *ayr* менее распространен в мире, но он идентифицирован у нескольких изолированных групп населения Океании [43, 152]. Географическое распределение подтипов, вероятно, отражает локализацию их происхождения и перемещения зараженного населения.

Иммунизация высокоочищенными частицами HBsAg обеспечивает защиту против заражения HBV [168, 215], так же как введение препаратов иммуноглобулина с высоким титром антигенов против HBsAg (анти-HBs) [105, 172, 191]; это свидетельствует о том, что защиту от повторной инфекции обеспечивает иммунный ответ именно на этот антиген. Доказано, что HBsAg — вирус-специфический антиген. Антигенный подтип, обнаруживаемый при вторичных случаях заражения HBV, обычно тот же, что и в исходном случае, или соответствует исходному возбудителю, используемому при экспериментальном заражении [110, 138]. Это свидетельствует о том, что детерминанты подтипов определяются вирусным, а не хозяйским геномсом. Таким образом, подтипы HBsAg являются очень полезными маркерами при эпидемиологическом изучении распространения вируса среди на-



селения, а также при изучении случаев его индивидуальной передачи. Более прямое доказательство того, что HBsAg кодируется вирусным геномом, получено при изучении аминокислотных последовательностей полипептидов HBsAg и последовательностей оснований вирусной ДНК [36, 162], а также при изучении экспрессии HBsAg в бактериях, трансформированных рекомбинантным плазмидным вектором, содержащим ДНК HBV [35].

Для определения химических свойств HBsAg сферические и нитевидные (22 нм)-частицы можно очистить с помощью гель-фильтрации, скоростного зонального центрифугирования и равновесного центрифугирования в градиенте плотности CsCl [50, 68]. При центрифугировании в градиенте плотности CsCl эти частицы отделяются от вируса благодаря различиям в их плавучих плотностях. Плавучая плотность (22 нм)-сферических частиц подтипов *adw* и *ayw* равна примерно 1,20 г/см<sup>3</sup> в CsCl и 1,17 г/см<sup>3</sup> в сахарозе [50, 68], что свидетельствует о значительном содержании в них липидов (приблизительно 30% веса). Более высокая плавучая плотность полных вирионов (приблизительно 1,28 г/см<sup>3</sup> для вирионов с нуклеокапсидом, содержащим ДНК, и 1,24 г/см<sup>3</sup> для вирионов с пустой сердцевинкой) отражает вклад нуклеиновой кислоты в нуклеокапсиды [88]. Липидный анализ высокоочищенных препаратов (22 нм)-частиц HBsAg выявляет смесь липидов [100, 207], сходную с найденной в оболочечных вирусах, что предполагает происхождение липидов из клетки-хозяина.

Средняя мол. масса частиц HBsAg/*adw* равна  $3,7 \cdot 10^6$ — $4,6 \cdot 10^6$  [31]. При изоэлектрическом фокусировании препаратов (22 нм)-частиц HBsAg выявляется несколько популяций с различными значениями *pI*, варьирующими от 3,65 до 5,3 [31, 32, 87]. Средний коэффициент седиментации для HBsAg варьирует от 39S до 54S [68]. Определение среднего удельного коэффициента экстинкции 1%-ного раствора очищенного белка HBsAg при 280 нм лежит в пределах от 37,3 до 60,0 [72, 239; Gerin, Buynak, неопубликованные данные].

Методом электрофореза в ДСН-ПААГ в очищенных препаратах (22 нм)-частиц HBsAg *adw*-, *ayw*- и *adr*-подтипов выделено семь или более полипептидов с мол. массой от 25 000 до 100 000 [52, 196]. Некоторые исследователи (см. обзор [177]) сообщают о присутствии двух самых маленьких полипептидов в качестве мажорных компонентов и более крупных полипептидов в качестве минорных компонентов. Хотя в разных работах размеры двух мажорных полипептидов варьируют, их средние размеры, установленные методом ДСН-ПААГ, обычно составляют 25 000 (p25) и 29 000 (p29). Судя по окрашиванию реактивом Шиффа [33, 197] и включению радиоактивных сахаров, больший из мажорных полипептидов (p29) и один или два более крупных минор-

ных компонента являются гликопептидами. Полипептиды р25 и р29 состоят из идентичных полипептидных цепей, так как они имеют идентичный аминокислотный состав [162, 196], идентичную последовательность 19 аминокислотных остатков, локализованных на N-конце, и одинаковую последовательность трех остатков на С-конце [162]. Поскольку р29 гликозилирован, возможно, что за очевидно ббльший размер р29 ответственны только углеводы. Пептидное картирование после расщепления трипсином показало, что два белка различаются только одним пятном из 27 [72]. Эта небольшая разница может быть связана с гликозилированием, с какими-то другими посттрансляционными модификациями одного из двух полипептидов или с различием в аминокислотных последовательностях; ясно, однако, что эти два белка имеют очень сходную первичную структуру.

Изолированные мажорные полипептиды содержат группо- и типоспецифические детерминанты HBsAg [49, 67] и при использовании их для иммунизации индуцируют анти-HBs-антитела [49, 67, 195]. Несколько выделенных минорных высокомолекулярных полипептидов также, по-видимому, содержат группо- и типоспецифические детерминанты HBsAg [49, 75, 195, 196]; это наводит на мысль, что указанные полипептиды не являются уникальными, но должны иметь по крайней мере несколько аминокислотных последовательностей, общих с меньшими мажорными полипептидами. Последнее подтверждается картированием триптических пептидов, показавшим, что высокомолекулярные пептиды содержат триптические пептиды, идентичные пептидам, найденным в белках меньшего размера [59]. Однако наличие дополнительных триптических пептидов указывает на то, что в больших полипептидах имеются уникальные аминокислотные последовательности, отсутствующие в белках меньшего размера. В полипептидах найдены подтиповые детерминанты, одинаковые с детерминантами в HBsAg-частицах, из которых они произошли. У других вирусов не обнаружено множества полипептидов различных размеров, каждый из которых содержит одни и те же антигенные детерминанты. В связи с тем что полипептиды, не содержащие углеводов, индуцируют анти-HBs-антитела, ясно, что вирус-специфические антигенные детерминанты содержатся в полипептидной, а не в углеводной части гликопротеинов. Ясно также, что как группо-, так и типоспецифические остатки находятся на одном и том же полипептиде. Таким образом, полипептиды различных подтипов HBsAg могут содержать участки постоянных аминокислотных последовательностей, определяющие группоспецифические детерминанты, например *d* или *y*. Однако точная структурная основа разницы подтипов еще не известна. Аминокислотный состав р25 и р29 в основном идентичен составу интактного HBsAg того же подтипа [162]. Последовательности пер-

вых девяти остатков N-конца и один остаток (изолейцин) С-конца у *ayw*- и *adw*-подтипов HBsAg также идентичны [162]. Поэтому различия в последовательностях полипептидов p25 находятся в каких-то других их участках. В триптических картах мажорного негликозилированного полипептида p25 из частиц HBsAg различных подтипов обнаружены существенные различия [59], так же как и в картинах рестриктазного расщепления геномной ДНК вирусов, относящихся к различным подтипам HBsAg [202], что свидетельствует о значительных различиях в первичной структуре.

Молекулярное клонирование ДНК HBV в бактериальных клетках и определение нуклеотидных последовательностей вирусной ДНК подтипа *ayw* [36], а также неизвестного подтипа [234] привело к идентификации последовательностей, кодирующих мажорный полипептид (p25), содержащий HBsAg. Концы предполагаемой кодирующей последовательности ДНК соответствуют известным N- и С-концам аминокислотной последовательности p25. Входящие в ДНК нуклеотидные последовательности кодируют белок, состоящий из 225 аминокислот с мол. массой 25 422 [36], что близко соответствует размеру p25, установленному с помощью ДСН-ПААГ. Рассчитанный из нуклеотидной последовательности этого гена аминокислотный состав близок к составу, описанному для p25 [162]. Предполагаемый полипептид имеет высокое содержание пролиновых остатков (10%), разбросанных по всей молекуле, т. е. в нем, по-видимому, мало длинных альфа-спиральных участков. Вместе с тем имеется несколько гидрофобных участков, и полипептид содержит также много цистеиновых остатков (6%), расположенных в центральной части полипептида. Химическое восстановление и алкилирование значительно уменьшают антигенную активность частиц HBsAg [51, 209, 238], из чего следует, что дисульфидные связи в этой области полипептида необходимы для оптимальной реактивности HBsAg. В этой связи важно отметить, что разрушение дисульфидных связей между цистеиновыми остатками 124 и 137 и алкилирование свободных тиоловых групп ликвидировали реактивность иммуногенного циклического синтетического пептида [53]. Для того чтобы полипептиды, выделенные после химического восстановления и ДСН-ПААГ-электрофореза, имели максимальную реактивность HBsAg, их необходимо вновь окислить.

В полипептиде отмечен также высокий процент серина (10%) и треонина (8%) — аминокислот, к которым обычно присоединяются сахарные остатки [36]. Три из пяти аспарагиновых остатков содержатся в трипептидах типа Asn — X — серин (или треонин), которые необходимы для формирования N-гликозидных связей [208]. Содержание триптофана (6%) и тирозина (3%) соответствует УФ-спектру p25 [71], который свидетельствует о вы-



соком отношении триптофан/тирозин. Некоторые участки гидрофильной области молекулы мажорного полипептида HBsAg (p25) синтезированы химически; они индуцируют у кроликов и мышей антитела, иммунопреципитирующие HBsAg-частицы из сыворотки и свободные полипептиды HBsAg [53, 113, 166, 237]. Указанными свойствами обладают синтетические пептиды, состоящие из аминокислотных остатков 2—16, 22—35, 48—81, 95—109 [113], 117—137 и 122—137, циклизированные с помощью дисульфидных связей [53], а также 134—146 [237] и 138—149 [166] (пронумеровано с N-конца p25, состоящего из 226 аминокислот). Девять синтетических пептидов, представляющих другие участки p25, не индуцировали формирования реагирующих антител. Представленные результаты указывают, что аминокислотные домены, вызывающие формирование реагирующих антител, находятся на поверхности HBsAg-частиц и несут HBsAg-детерминанты. Секвенирование нуклеотидов ДНК и создание синтетических пептидов на основе такого секвенирования представляют собой подход, который может привести к детальному пониманию различий подтипов HBsAg, однако для этого необходимо клонировать в бактериальных клетках ДНК вирусов разных подтипов HBsAg и секвенировать участки, кодирующие HBsAg.

Несмотря на четкие доказательства расположения детерминант HBsAg в полипептидной цепи, изолированные полипептиды обычно слабее реагируют с анти-HBsAg-антителами и менее иммуногенны, чем интактные HBsAg-частицы. Однако адсорбированные на алюминии мицеллярные полипептидные вакцины, содержащие оба белка, p25 и p29, вызывали у человека более высокий анти-HBs-ответ, чем вакцина из адсорбированных на алюминии интактных HBsAg-частиц [83a]. Обработка интактных HBsAg-частиц периодатом или гликозидазой и нейраминидазой вызывает значительную потерю HBsAg-реактивности [28]. Это наводит на мысль, что для полной антигенности интактных частиц углеводы все-таки необходимы. Связывание HBsAg-частиц с лектинами позволяет предположить, что углеводы расположены на поверхности частицы. В связи с этим были предприняты попытки очистить частицы с помощью аффинной хроматографии на колонках с конканавалином А [145]. Связывание HBsAg-частиц с лектинами, специфическими для сиаловой кислоты, и с лектинами земляных орехов, специфическими для  $\beta$ -галактозы, соответственно до и после обработки нейраминидазой [144, 147], свидетельствует о том, что эти два сахара могут быть последним и предпоследним остатками поверхностного углевода. Обработка протеазой не разрушает HBsAg-реактивности интактных HBsAg-частиц [28], как это происходит со свободными полипептидами, т. е., по-видимому, критический участок HBsAg-реактивных полипептидов в собранных частицах недоступен для протеаз.

Препараты (22 нм)-частиц всегда содержат небольшие количества сывороточных белков [27, 135, 146], которые не удается удалить при тщательной очистке. Еще не ясно, являются ли они минорными внутренними компонентами частиц, или просто прочно связаны с поверхностью частиц, или же только загрязняют препараты и очищаются вместе с HBsAg. Единственным сывороточным компонентом, присутствующим в очищенных препаратах HBsAg в количествах, позволяющих выявить его при окрашивании ДСН-гелей кумасси, является человеческий сывороточный альбумин, который либо комигрирует как отдельный полипептид с одним из вирус-специфических полипептидов [198], либо представляет собой интегральный компонент пептида с мол. массой 68 000 [186]. Из нескольких лабораторий поступили сообщения о том, что HBsAg-частицы и HBsAg-полипептиды содержат рецепторы для полимеризованного альбумина [89, 91, 92, 143] и что именно прочным связыванием сывороточного альбумина с этими рецепторами объясняется присутствие значительных количеств этого белка в очищенных препаратах HBsAg. Присутствие рецепторов для альбумина не только на интактных частицах HBsAg, но и на полипептидах свидетельствует о вирусном происхождении рецепторов.

В связи с тем что наружная оболочка вирионов гепатита В содержит HBsAg и, очевидно, липиды, предположили, что ее химический состав сходен с тем, который описан для (22-нм)-частиц HBsAg. Однако прямого химического анализа оболочки вирионов не проводили. Некоторые исследователи считают, что вирионы могут иметь добавочные поверхностные антигенные детерминанты, которых нет на других корпускулярных формах HBsAg [149], однако в ряде работ подтвердить это не удалось [69, 224].

Поверхностные антигены WHV [240] и GSHV [72, 123] показывают значимую, хотя и минимальную специфическую перекрестную реакцию с HBsAg. Два мажорных полипептида поверхностного антигена GSHV сходны с соответствующими белками HBsAg, хотя и имеют явно меньшие размеры. Только одна треть пептидов триптического гидролизата, полученных из полипептидов поверхностного антигена GSHV, идентична пептидам HBsAg, а две трети — различаются [72]. Это говорит о том, что, хотя GSHV и WHV родственны HBV, они не идентичны ему. Вероятно, все три вируса дивергировали от общего предшественника в отдаленном прошлом. Поверхностный антиген DHV не дает перекрестных серологических реакций ни с одним из вирусов млекопитающих (HBV, GSHV и WHV) [121, 127]. Он содержит один мажорный полипептид, несколько отличающийся от мажорных полипептидов других вирусов по размеру (17,5K) и хромографической картине триптического гидролизата [122]. По-

следняя указывает на более отдаленную связь DHV с вирусами млекопитающих по сравнению со связью этих вирусов между собой. О подтипах или других антигенных вариациях поверхностных антигенов WHV, GSHV или DHV пока ничего не известно.

### СТРУКТУРА ВИРУСНЫХ НУКЛЕОКАПСИДОВ

Сердцевина вириона, или нуклеокапсид, несет сердцевинный антиген гепатита В (HBcAg). Этот антиген обнаружен в крови как внутренний компонент вирионов. Свободный HBcAg иногда определяется в сыворотке в ранний период виремии, до появления антител к HBcAg (анти-HBc) [83]. Сердцевина вириона представлена на рис. 31.2, Б и 31.3. Частицы, несущие HBcAg и имеющие под электронным микроскопом вид сердцевин вириона, выделены также из гомогенатов печени, зараженной HBV [61, 85]. Показано, что значительная фракция HBcAg-частиц, выделенных из вирионов [88], и меньшая фракция их, выделенная из зараженной печени [180], имеют высокую плавучую плотность в CsCl ( $1,38 \text{ г/см}^3$ ) и содержат ДНК и ДНК-полимеразную активность. Однако плавучая плотность большинства HBcAg-частиц из ткани зараженной печени и многих частиц из вирионов [61, 88, 96] ниже ( $1,28\text{—}1,33 \text{ г/см}^3$ ), так как в них мало или совсем нет ДНК, т. е. они представляют собой пустые частицы, в которых ДНК-полимераза также отсутствует. Когда иодированные препараты частиц, полученных из плазмы, подвергли электрофосфорилированию в градиенте pH, они дали мажорные пики активности HBcAg при pH 4,0. В аналогичных условиях на препаратах из сердцевинных частиц, выделенных из ядер гепатоцитов, подобные пики получили при pH 3,7 [61]. Сердцевинны WHV и GSHV имеют ультраструктуру, сходную со структурой сердцевинны HBV, но у сердцевинны DHV имеются еще «шипы», выступающие на поверхности частиц [127].

Установлено, что высокоочищенные сердцевинны, полученные из вирионов, и HBcAg-частицы, выделенные из печени, содержат несколько уникальных полипептидов с мол. массой от 19К до 38К [26, 61, 88, 218]. Антигенная специфичность этих полипептидов достаточно хорошо не определена, однако есть данные, что полипептид 19К может, как описано в разделе, посвященном HBeAg, реагировать с антителами к е-антигену гепатита В (анти-HBe). После выделения этот полипептид, очевидно, также несет HBcAg-детерминанту [137]. Другие попытки получить растворимый HBcAg из частиц сердцевинны оказались безуспешными.

В сердцевине вирионов и HBcAg-частиц из печеночной ткани, зараженной HBV, была найдена протеинкиназа [1]. С помощью этого фермента интенсивно фосфорилируется только один мажорный (19К) полипептид из частиц сердцевинны. Аналогичная ситуа-



ция наблюдается и у других вирусов с оболочкой, у которых фосфорилированные вирионные полипептиды связаны с вирусной нуклеиновой кислотой. Пока роль протеинкиназной активности в вирусной инфекции и репликации еще не ясна.

Хотя детального сравнения антигенной специфичности НВсАг из разных источников еще не проводили, сообщений об антигенной варибельности или гетерогенности также нет. Считают, что НВсАг кодируется вирусом. Он определяется только во время инфекции НВV; после заражения наблюдается ранний и быстрый антительный ответ на НВсАг [104]; по-видимому, этот антиген является внутренним компонентом вириона [6]. К прямому доказательству кодирования НВсАг вирусом относится экспрессия НВсАг бактериальными клетками, которые трансформированы гибридной плазмидой, содержащей ДНК НВV [29, 56]. Антигены сердцевин WHV [240] и GSHV [60] в незначительной степени перекрестно реагируют друг с другом и с НВсАг и совсем не реагируют с DHV. Подобно сердцевине из НВV, сердцевина GSHV содержит протеинкиназную активность, которая фосфорилирует мажорный полипептид сердцевин.

#### ПРИРОДА e-АНТИГЕНА ГЕПАТИТА В

e-Антиген гепатита В (НВеАг), впервые идентифицированный в 1972 г., физически и антигенно отличается от НВсАг и НВсАг [119]. Правда, следует отметить, что он трудно поддается очистке и химически охарактеризован еще недостаточно. Имеются данные о том, что НВеАг представляет собой комплекс антигенов. При определении в сыворотках отдельных больных методом диффузии в агаровом геле он дает до трех линий преципитации, обозначаемых  $e_1$ ,  $e_2$  и  $e_3$  [44, 134, 216, 242]. В сыворотках больных гепатитом В определяются как связывающийся с иммуноглобулином G (IgG) НВеАг с мол. массой 300K [118, 221], так и меньший «свободный» НВеАг с мол. массой 30—35K [221, 223, 225]. Свободная форма, по-видимому, способна диссоциировать на меньшие полипептиды с мол. массой 15,5K [148, 220, 225]. Возможно, что  $e_1$ ,  $e_2$  и  $e_3$  представляют различные комплексы НВеАг с иммуноглобулином или без него, но для того, чтобы определить действительные структурные или химические различия между ними, необходимы дальнейшие исследования. Изоэлектрическое фокусирование сывороточных фракций, содержащих  $e_1$ , выявило гетерогенность по заряду, причем большая часть антигена определялась между рН 4,5 и 5,0 [225]. Антиген, по-видимому, термолабилен и чувствителен к сульфгидрильным реагентам.

Особо следует отметить, выраженную корреляцию присутствия НВеАг в сыворотке больных с высокой концентрацией физи-

ческих вирусных частиц [9, 80, 153, 222] и инфекционного HBV [190, 201]. Это наводит на мысль, что HBeAg и вирионы продуцируются вместе во время инфекции, и свидетельствует о возможности прямой физической связи между ними. К тому же накапливаются данные о том, что HBeAg является компонентом сердцевины вириона. При разрушении сердцевины вириона детергентом из нее высвобождается HBeAg [25, 142, 157, 218]. Высвобождающийся при этом мажорный полипептид сердцевины (19K) реагирует только с анти-HBe и не реагирует с анти-HBc [218]. Однако при введении кроликам полипептид 19K стимулирует образование антител не только к HBeAg, но и к HBcAg, т. е. в одной молекуле этого полипептида расположены эпитопы обоих антигенов. По-видимому, стандартные методы могут оказаться негодными для определения HBcAg на полипептиде, если на молекуле существует только одна детерминанта HBcAg. Связывая пептид с твердой фазой, покрытой антителами к HBeAg, Миикава и Майуми [137] легко выявили наличие HBcAg-детерминанты, поддерживая таким образом это предположение. Для WHV, GSHV и DHV не обнаружено антигенов, перекрестно реагирующих с HBeAg.

#### **ФИЗИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВИРУСНОЙ ДНК**

Вирионы гепатита В содержат маленькую кольцевую частично двухцепочечную молекулу ДНК [182] (рис. 31.4); одноцепочечные участки варьируют по длине, составляя в различных молекулах от ~15 до 60% длины окружности [89, 107, 212]. Таким образом, ДНК состоит из длинной цепи (L) постоянной длины (~3 220 оснований) во всех молекулах и короткой цепи (S), которая в различных молекулах варьирует по длине от 1700 до 2800 оснований [107]. ДНК-полимераза достраивает одноцепочечные участки вирусной ДНК до полностью двухцепочечной молекулы, содержащей приблизительно 3200 bp. Синтез ДНК начинается на 3'-конце короткой цепи, который в разных молекулах находится на различных участках в пределах специфической области ДНК и заканчивается по достижении 5'-конца короткой цепи, расположенного в строго определенном месте. Длинная цепь не является замкнутой окружностью: в точке, расположенной приблизительно на расстоянии 300 bp от 5'-конца короткой цепи, существует разрыв [187, 202, 212]. С помощью нагревания при определенных условиях, которое вызывает избирательную денатурацию 300-нуклеотидной области между 5'-концом короткой цепи и разрывом в длинной цепи, кольцевая ДНК может быть превращена в линейную форму с одноцепочечными липкими концами [187]. Линейная форма может быть вновь переведена в кольцевую путем

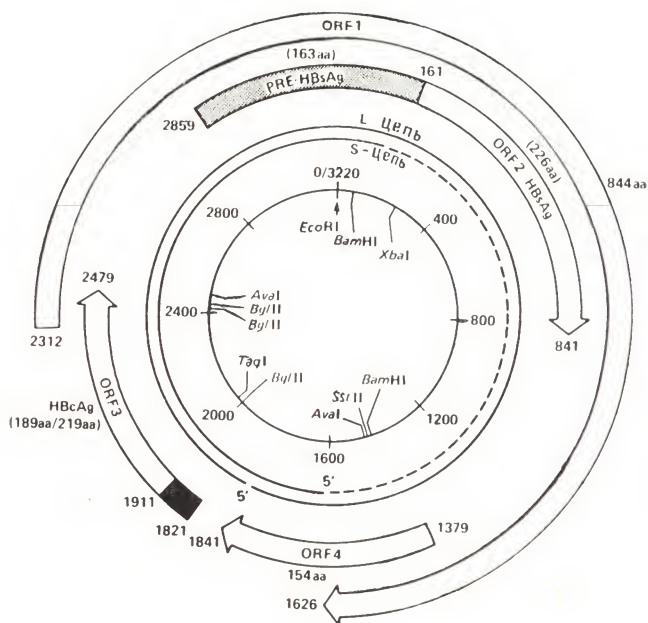


Рис. 31.4. Физическая и генетическая карта ДНК HBV (HBsAg, *adw<sub>2</sub>*). Штриховая линия обозначает участок короткой (S) цепи ДНК, в пределах которого в различных молекулах находится 3'-конец. Соответственно одноцепочечный участок длинной (L) цепи может иметь разную длину в различных молекулах. Сайты рестрикции, локализация одноцепочечного разрыва в L-цепи, 5'-конец S-цепи и локализация одноцепочечного участка даны по Сидикуи и др. [202], а открытые рамки считывания (большие стрелки) по Галиберту и др. [63].

реассоциации комплементарных одноцепочечных концов. По-видимому, 5'-концы обеих, как длинной, так и короткой, цепей ДНК HBV блокированы таким образом, что предотвращено их фосфорилирование полинуклеотидкиназой [70]. Химическая природа блока 5'-конца короткой цепи неизвестна. К 5'-концу длинной цепи ДНК, выделенной из вирионов, ковалентно присоединен полипептид, что, несомненно, предотвращает фосфорилирование этой цепи [70].

ДНК HBV клонирована в бактериальных клетках и секвенирована [63, 235]. Она имеет четыре открытые рамки считывания в полной, или длинной, цепи, которая, следовательно, является минус-цепью (согласно договоренности плюс-цепь вирусной ДНК имеет ту же последовательность нуклеотидов, что и вирусная мРНК, а минус-цепь комплементарна мРНК). Идентифицированы кодирующие последовательности для двух мажорных вирионных полипептидов. Открытая рамка считывания 2 (см. ORF2 на



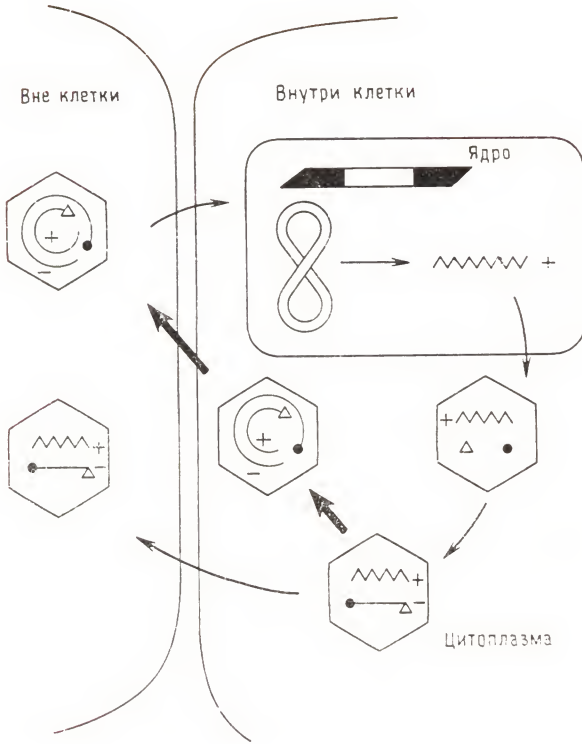
рис. 31.4) содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мажорный HBsAg-реактивный полипептид. Эта последовательность длиной 678 нуклеотидов детерминирует полипептид из 226 аминокислот с мол. массой 25 422. Последовательность, расположенная выше иницирующего кодона для этого полипептида в ORF2, называется пре-S-участком; если он транслируется *in vivo*, то должен синтезироваться большой предшественник р25 с С-концевой последовательностью, идентичной этой последовательности р25. Действительно ли *in vivo* образуется такой предшественник или этот пре-S-участок имеет какие-то другие функции, нужно еще определить. Открытая рамка считывания 3 (рис. 31.4.) содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует мажорный полипептид сердцевины вириона. Эта последовательность детерминирует белок из 183 аминокислот. Полипептиды, кодируемые двумя другими рамками считывания (ORF1 и ORF4, рис. 31.4), еще не идентифицированы. ORF1 полностью перекрывает ORF2, содержащий S-ген. ORF1 потенциально может кодировать белок с мол. массой 95 000. ORF4 — самая маленькая потенциально кодирующая последовательность длинной цепи — может кодировать полипептид с мол. массой ~ 16 000, содержащий 154 аминокислоты. ДНК HBV и WHV внутри самой маленькой открытой рамки считывания, расположенной на длинной цепи (ORF4) поблизости от одноцепочечного разрыва, имеет последовательность, которая может формировать стабильную шпильчатую структуру; выдвинута гипотеза о возможной функции этой последовательности в качестве сайта начала репликации.

#### **HBV В ЗАРАЖЕННЫХ КЛЕТКАХ И МЕХАНИЗМ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА**

В самых ранних исследованиях HBV, проведенных на зараженных гепатоцитах, с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания показано, что HBsAg присутствует только в ядрах гепатоцитов, а HBsAg — в цитоплазме и на клеточной поверхности [13, 77, 169]. Соответственно под электронным микроскопом частицы, похожие на сердцевины вирионов, выявлены исключительно в ядрах гепатоцитов [7, 30, 90]. Частицы, напоминающие те или иные формы HBsAg, в клетках определить не удалось, и морфогенез этих частиц, а также полных вирионов не известен. При персистентной инфекции с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания выявляются разные количества клеток, содержащих регистрируемый вирусный антиген (от <1% до фактически всех гепатоцитов у разных больных) [13, 77, 169]. В разных клетках одной и той же хронически инфицированной печени картина экспрессии вирусного антигена, по-видимому, различна. Чаще

всего наибольшее число клеток окрашивается положительно только на HBsAg, меньшее число клеток содержит только HBcAg и еще меньше клеток содержат оба антигена — HBsAg и HBcAg. В печени некоторых хронических носителей единственным определяемым антигеном является HBsAg. У всех носителей, продуцирующих вирионы с относительно высокой концентрацией вирусной ДНК-полимеразы и значительные количества вирусной ДНК, обнаруживается значительное число HBcAg-положительных клеток. Присутствие различных вирусных антигенов в клетках одной и той же хронически инфицированной печени свидетельствует о том, что в разных клетках отдельные вирусные гены экспрессируются по-разному.

Изучены формы вирусной ДНК и ее синтез в печени уток, зараженных DHV [126, 210], и в печени человека, зараженного HBV [132, 133]. Полученные результаты позволяют предположить, что ДНК этих вирусов реплицируется уникальным способом. ДНК HBV присутствует в зараженных клетках печени носителей HBsAg в нескольких формах. Преобладающая форма (форма I) обнаруживается исключительно в клеточных ядрах и представляет собой замкнутую кольцевую форму ДНК, состоящую из 3200 bp [133]. Несколько форм ДНК присутствует в цитоплазме клеток печени, и, по-видимому, они находятся в частицах с ДНК-полимеразной активностью [132, 133]. Сходные частицы, обладающие свойствами сердцевины вируса, выявлены в зараженной DHV печени уток [210]. Частицы из зараженной HBV печени человека содержат состоящую из 3200 bp релаксированную кольцевую (форма II) и линейную (форма III) вирусную ДНК; одноцепочечные фрагменты вирусной ДНК, состоящие из 3200 нуклеотидов, и молекулы вирусных гибридов ДНК—РНК [132, 133]. В системе DHV гибридные молекулы, по-видимому, содержат имеющие *poly*(A)-последовательности плюс-цепи вирусной РНК полной длины (3200 нуклеотидов) [210]. Эндогенная ДНК-полимеразная активность частиц катализирует включение нуклеозидтрифосфатов в негативные ДНК-цепи гибридных вирусных молекул ДНК—РНК в присутствии или в отсутствие актиномицина D, подавляющего ДНК-зависимый синтез ДНК. Эти данные позволяют предположить, что плюс-цепь ДНК синтезируется на РНК-матрице обратной транскриптазой с помощью механизма, аналогичного механизму, известному для ретровирусов. В системе DHV РНК-цепь гибридной молекулы ДНК—РНК деградирует по мере увеличения длины ДНК-цепи, что напоминает аналогичное явление у ретровирусов, где это происходит под действием РНКазы Н. Данные, полученные в системе DHV, наводят на мысль, что праймером для синтеза минус-цепи ДНК служит белок, причем уже обнаружено, что в процессе роста эта цепь в гибридной молекуле ДНК—РНК ковалентно связана с



**Рис. 31.5.** Предполагаемый механизм репликации HBV.  $\sim\sim\sim$  РНК; — ДНК;  $\blacksquare$  хозяйская ДНК;  $\bullet$  белок-затравка;  $\triangle$  ДНК-полимераза.

белковой затравкой Нуклеозидтрифосфаты включаются также в плюс-цепь релаксированных кольцевых молекул ДНК в ДНК-зависимой реакции.

Приведенные выше данные, полученные на клетках печени человека, зараженных HBV, и клетках печени уток, зараженных DHV, позволяют построить следующую рабочую модель (рис. 31.5) репликации вирусов гепатита В. После проникновения вируса в клетки печени в клеточных ядрах формируются замкнутые кольцевые вирусные ДНК, состоящие из 3200 бп. Они могут функционировать как матрицы для синтеза вирусной мРНК и синтеза плюс-цепи РНК размером 3200 нуклеотидов, которая в свою очередь служит матрицей для синтеза минус-цепи ДНК. Плюс-цепь РНК полной длины, новосинтезированная вирусная ДНК-полимераза (обратная транскриптаза) и белок-затравка для синтеза минус-цепи ДНК собираются в комплекс с



мажорным структурным полипептидом сердцевины вируса и образуют сердцевину, или нуклеокапсид вируса. Затем внутри нуклеокапсида синтезируется минус-цепь вирусной ДНК. В этом процессе используются белковая затравка и РНК-матрица, которая постепенно по мере синтеза ДНК деградирует под действием РНКазы Н. На матрице минус-цепи ДНК в кольцевой конформации синтезируется плюс-цепь вирусной ДНК. Затем частицы сердцевины собираются в полные вирионы с HBsAg и липидсодержащими оболочками клеточной мембраны. В случае HBV [132, 133] формирование вируса и выделение его из клетки могут происходить, очевидно, на любой ступени после сборки сердцевины, так как вирионы (частицы Дейна), содержащие молекулы гибридов ДНК — РНК, а также частично одноцепочечные кольцевые ДНК обнаруживаются в крови. Эндогенная ДНК-полимераза в вирионах катализирует включение нуклеотидов в минус-цепи ДНК гибридов РНК — ДНК и в плюс-цепи ДНК частично одноцепочечных молекул.

Результаты обработки ДНК из зараженной HBV печени рестрикционными эндонуклеазами и последующего анализа методом блотинга по Саузерну позволяют считать, что во многих, а может быть, и во всех случаях последовательности вирусной ДНК интегрируются с клеточной ДНК. Доказательства этому получены в ряде работ [23, 95], в которых после (но не до) расщепления клеточной ДНК рестрикционным ферментом (например, *Hind III*), не способным расщеплять ДНК вируса, были обнаружены один или несколько фрагментов, содержащих вирусную ДНК и превышающих ее по размеру (т. е.  $>3200$  bp). В препаратах печени, полученной от разных хронически инфицированных больных, эти высокомолекулярные *Hind III*-ДНК-фрагменты различаются. Полагают, что возможность определять такие ДНК-фрагменты блотингом по методу Саузерка обусловлена включением вирусной ДНК в одни и те же участки разных клеток печени у одного и того же больного, но у разных больных эти участки различаются. Однако прямых доказательств этого утверждения пока нет. Другие вирусы, легко интегрирующие с клеточной ДНК, например ретровирусы, включаются во многие и, вероятно, случайные участки клеточной ДНК. У них специфические участки интеграции с помощью описанного выше подхода для HBV определить не удастся или, точнее удастся только для клонов клеток, например клеток большинства опухолей, индуцированных вирусами (см. обзор [236]). Включение вирусной ДНК в специфические участки ДНК клеток печени, инфицированной HBV (хотя, очевидно, в разные у различных больных), пока явление уникальное.

Есть работы [102, 132], в которых сообщалось о включении ДНК HBV в случайные сайты интеграции. Авторы этих работ

выявили субгеномные фрагменты ДНК, содержащие последовательности ДНК HBV, после расщепления ДНК клеток инфицированной печени рестрикционным ферментом, расщепляющим ДНК HBV в нескольких участках. При этом не обнаруживали фрагментов, превышающих длину генома, определяемых в опыте с *Hind III*.

Последовательности вирусной ДНК, интегрированной с ДНК клеток инфицированной печени, детально не охарактеризованы. Ясно, однако, что в клетках печени, в которых реплицируется HBV, интегрированная вирусная ДНК встречается в значительно меньших количествах ( $< 1$  копии на клетку), чем свободная вирусная ДНК ( $> 500$  копий на клетку) [95, 132]. Хотя роль интегрированной вирусной ДНК в репликации не установлена, показано, что ген *HBsAg* экспрессируется в клетках, в которых вирусная ДНК присутствует только в интегрированном состоянии. Экспрессии других вирусных генов, находящихся в интегрированной форме, не наблюдается. Пока неизвестно: а) интегрированы ли в зараженных клетках печени весь геном вируса или только его часть, б) сохраняется ли в интегрированных участках порядок последовательностей, присущий вирионной ДНК (исключение представляет ген *HBsAg*, о котором известно, что для экспрессии в интегрированном состоянии он должен быть интактным), в) происходит ли включение по специфическим или случайным сайтам вирусной ДНК. Для того чтобы получить более прямые доказательства интеграции и ответить на поставленные выше вопросы о состоянии вирусной ДНК и ее роли в жизненном цикле вируса, необходимы дальнейшие исследования по клонированию и секвенированию интегрированной вирусной ДНК.

Состояние интегрированной вирусной ДНК в первичной гепатоцеллюлярной карциноме человека и сурка, а также в клеточных линиях гепатомы человека в культуре ткани изучено более детально. Многие из них (но не все), по-видимому, содержат интегрированную ДНК вируса. После расщепления опухолевой ДНК рестрикционной эндонуклеазой *Hind III* и последующего анализа методом блотинга по Саузерну были выявлены фрагменты ДНК, содержащие вирусные последовательности, причем эти фрагменты превосходили по длине вирусную ДНК и были сходны с упомянутыми выше фрагментами из неопухолевой ткани инфицированной печени. Эти данные свидетельствуют о том, что вирусная ДНК интегрирует со специфическими участками клеточной ДНК в ткани гепатоцеллюлярной карциномы, однако в разных опухолях эти участки различаются [23, 24, 37, 125, 131, 192, 193]. Клонированием и секвенированием интегрированной вирусной ДНК с фланкирующими последовательностями клеточной ДНК было доказано, что вирусные последовательности интегрируют с хозяйской ДНК первичной гепатоцеллюлярной кар-

циномы. Проведенные на современном уровне опыты на опухолях сурков [156] и человека показали, что вирусная ДНК содержит обширные делеции и перестройки, специфичные для каждой интегрированной вирусной последовательности. Кроме того, для каждой включенной ДНК участки соединения вирусной и клеточной ДНК также специфичны. В одной гепатомной клеточной линии последовательности ДНК HBV, по-видимому, интегрированы по крайней мере с восемью специфическими участками клеточной ДНК, причем эти последовательности в значительной степени метилированы в отличие от ДНК HBV в вирионах или в неопухолевой зараженной вирусом ткани печени [131]. Более интенсивное метилирование последовательностей, кодирующих полипептид сердцевины, по сравнению с метилированием последовательностей, кодирующих полипептид HBsAg, коррелирует с экспрессией HBsAg в этой клеточной линии и отсутствием экспрессии HBcAg или продуктов других вирусных генов. Эти факты позволяют предположить, что метилирование вирусной ДНК может играть определенную роль в регуляции экспрессии вирусных генов в гепатомах.

### ТКАНЕВАЯ ТРОПНОСТЬ

Некоторое время гепатоциты рассматривались как единственный тип клеток, инфицируемых HBV [140, 155, 199], и когда в одном случае [93] после трансплантации печени удалось добиться полного исчезновения инфекции, решили, что печень была единственным местом инфекции. Однако наличие высокой концентрации HBsAg в панкреатическом соке некоторых больных [81] заставило задуматься о том, не заражает ли иногда HBV клетки поджелудочной железы. Позднее при исследовании 30 случаев HBV-инфекции человека с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания в клетках поджелудочной железы обнаружили HBsAg и HBcAg (в 18 и 6 случаях соответственно) при отсутствии этих антигенов в контролях [98]. Высокая концентрация ДНВ в поджелудочной железе зараженных этим вирусом пекинских уток [127] позволяет предположить, что у них этим вирусом, близким к HBV, заражается поджелудочная железа. Таким образом, кроме печени у некоторых больных, а также у уток могут инфицироваться клетки поджелудочной железы. Других публикаций, посвященных репликации вируса в поджелудочной железе, пока нет. Недавно у больных гепатитом В при биопсии костного мозга идентифицированы клетки, положительные на HBsAg [184].



## ПАТОГЕНЕЗ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ HBV

## Острый и хронический гепатиты В

Острый и хронический гепатиты В представляют собой синдромы гепатоцеллюлярного некроза и воспалительных реакций, связанных с заражением гепатоцитов HBV. При первичной инфекции HBV заболевание печени может быть слабо выражено или вообще отсутствовать либо гепатит может быть острым различной тяжести — от мягкого до молниеносного [160]. При персистентной инфекции иногда состояние печени может быть гистологически нормальным или близким к нормальному, а ее функционирование нормальным, а иногда состояние и функционирование печени характеризуется синдромами «хронический персистентный гепатит» или «хронический активный гепатит» [160]. Хронический персистентный гепатит обычно рассматривают как непрогрессирующий, тогда как хронический активный гепатит — более тяжелое заболевание, часто прогрессирующее до цирроза. Кроме того, с хронической HBV-инфекцией тесно связано последующее развитие первичной гепатоцеллюлярной карциномы (см. следующий раздел «Первичная гепатоцеллюлярная карцинома»). Наконец, HBV-инфекция может быть также ответственна за различные проявления в других органах помимо печени, которые, очевидно, являются результатом иммунного ответа на инфекцию [73, 74].

Механизм повреждения клеток печени при гепатите В не установлен, но существует множество предположений о роли, которую играет в нем иммунный ответ [48, 55]. Идентифицировано несколько факторов, коррелирующих со степенью тяжести острого и хронического гепатита В, которые могут дать ключ к патогенезу этого заболевания. Среди этих факторов — доза инфицирующего вируса; при более высоких дозах HBV обычно наблюдается более короткий инкубационный период и более тяжелое течение острого гепатита, чем при более низких дозах [12]. Вторым фактором, по-видимому, является возраст. Для юного возраста характерно очень мягкое течение гепатита [189, 228]. Парадоксальным образом у иммунологически дефектных хозяев HBV-инфекция протекает более мягко, чем у иммунологически нормальных [114, 154]. Эти наблюдения заставляют задуматься о возможном влиянии иммунного ответа на тяжесть острого гепатита В.

Во время острой и хронической HBV-инфекции почти всегда развивается гуморальный иммунный ответ на HBsAg и HBsAg [5, 106, 117], а во многих случаях и на HBeAg [3, 159, 219]. Есть также данные о том, что при хронических гепатитах проявляется гуморальный иммунитет к печеночным (хозяйским) антигенам

[55]. Однако участие гуморального иммунного ответа в повреждениях печени при гепатите следует исключить в связи с тем, что тяжелые острые и хронические вирусные гепатиты встречаются и в отсутствие нормального гуморального иммунного ответа, например у больных с агаммаглобулинемией [65, 76].

Многочисленные исследователи сообщают о клеточном иммунном ответе при острых и хронических гепатитах В, направленном против HBV-антигенов и (или) антигенов клеток печени [41, 48, 55, 108]. Специфическая клеточная иммунореактивность к HBsAg определяется при остром гепатите по тестам подавления миграции лейкоцитов и трансформации лимфоцитов, варьирует при хроническом гепатите В и наиболее сильно и регулярно выражена в период выздоровления и вскоре после него. У носителей HBsAg, не имеющих заболевания печени, сенсibilизация клеток к HBsAg при использовании данного метода часто не определяется или определяется в очень незначительной степени. Выявленная у больных хроническим активным гепатитом иммунофлуоресцентным окрашиванием [77, 169] локализация HBsAg на поверхности клеток (в отличие от цитоплазматической локализации у лиц со слабовыраженным заболеванием печени или при полном его отсутствии) рассматривается как состояние, подходящее для иммунной атаки, направленной на HBsAg. Известны сообщения о цитотоксичности лимфоцитов больных гепатитом В для искусственных или нефизиологических клеток-мишеней, таких, как эритроциты птиц, несущие химически связанный HBsAg. Что же касается эффекторных клеток против линии клеток гепатомы человека, продуцирующей HBsAg, то данные об их антигенспецифической цитотоксической активности противоречивы [48, 55]. Некоторые исследователи [39, 47] не смогли найти какой-либо цитотоксической активности эффекторных клеток у лиц, переболевших гепатитом В, или у больных острым гепатитом В. Вместе с тем другие [38], используя монослой гепатомных клеток-мишеней, секретирующих HBsAg (клеточная линия Александера), определили нерестриктированный HLA цитотоксический ответ активированных интерфероном НК-подобных (ни В-, ни Т-) лимфоцитов, полученных от выздоравливающих от гепатита В больных. Цитотоксичность не обнаружена в моноклеарных клетках периферической крови нормальных доноров или больных, инфицированных ранее вирусами гепатита А или гепатита какого-либо еще типа помимо А или В. Это позволяет думать, что лимфоциты могут играть роль в защитном ответе хозяина при заражении гепатитом В.

При вирусном гепатите показана также сенсibilизация клеток к хозяйским антигенам [48]. Примерно у половины больных острым гепатитом В была определена сенсibilизация к печеночноспецифическим поверхностным мембранным липопротеинам ге-

патоцитов (печеночноспецифические белки, или LSP, от англ. liver specific protein), но она оказалась временной и не выявлялась после выздоровления [112, 139]. Реактивность к LSP выявляется также у большинства больных хроническим активным гепатитом независимо от наличия у них HBsAg-положительной реакции. Угнетенная у больных острым или хроническим гепатитом активность Т-супрессоров с выздоровлением возвращается к норме [40].

Изложенные здесь факты привели некоторых исследователей к заключению, что главную роль в повреждении печени при острых и хронических гепатитах В играет клеточная реактивность к HBsAg и (или) к антигенам гепатоцитов (например, к LSP). Хотя этот механизм в настоящее время не доказан, в его пользу говорит недавнее обнаружение у лиц, иммунных к гепатиту, цитотоксических эффекторных клеток, направленных против несущих HBsAg клеток-мишеней [38]. Следует отметить, что некоторые вирусные маркеры в сыворотке и печени персистентно инфицированных больных более часто регистрируются у больных с выраженным хроническим гепатитом. HBeAg и активность вирионной ДНК-полимеразы в сыворотке [2, 57, 58, 79, 120, 150, 170, 173, 203, 230], а также HBcAg и HBsAg в печени [77, 79, 169] часто определяются у больных хроническим активным гепатитом или хроническим персистирующим гепатитом, причем разница в распространении указанных маркеров при этих синдромах незначительна [57, 120, 150, 203]. В противоположность этому «здоровые» носители [2, 120, 230], включая тех, у которых отсутствие отклонений или их незначительность подтверждены биопсией печени [79, 173], часто HBeAg-негативны, не имеют вирионной ДНК-полимеразы [79] и при этом часто анти-HBe-позитивны [2, 79, 120, 150, 173]; более того, при биопсии печени и иммунофлуоресцентном окрашивании у них выявляются только HBsAg и не выявляются HBcAg [77, 79, 169]. Подобные результаты наводят на мысль, что в клетках больных хроническим гепатитом репликация полного вируса происходит чаще, чем в клетках носителей со слабовыраженным или совсем не выраженным гепатитом; у последних чаще удается выделить только продукт экспрессии одного вирусного гена — HBsAg. В связи с этими данными возникает вопрос о том, что в повреждении печени при HBV-инфекции играет роль клеточный иммунный ответ против HBcAg или HBeAg (или какого-то еще не обнаруженного вирусного антигена), но только не HBsAg. Это предположение подтверждается результатами исследования, в котором сообщается о цитотоксичности клеток периферической крови для аутологичных гепатоцитов при хронических гепатитах В; цитотоксичность блокируется анти-HBc, и это наводит на мысль о том, что HBcAg может быть антигеном-мишенью для цитотоксических клеток [54]. Бо-



лее того, была показана HBcAg-реактивность поверхности гепатоцитов больных хроническим гепатитом В [231].

В поддержку гипотезы о связи повреждения печени при гепатитах В с иммунным ответом часто выдвигают убедительный довод о том, что HBV — не цитопатический вирус. В пользу данного мнения приводятся наблюдения, свидетельствующие о том, что в культивируемых линиях гепатомы, в клетках которых содержится полный геном HBV, целый вирус не продуцируется, а экспрессируется только HBsAg, и при этом не наблюдается повреждения роста или функций клеток [116, 124]. В клетках здоровых носителей, продуцирующих только HBsAg, также нет повреждений печени или они выражены очень слабо [79]. Однако эти наблюдения не исключают возможности цитопатической инфекции, если в инфицированных HBV клетках реплицируется вирусная ДНК, а кроме HBsAg экспрессируется еще HBcAg, HBeAg и продукты других вирусных генов. К тому же сочетание HBeAg в сыворотке и HBcAg в печени с активным гепатитом совместимо с таким механизмом. Следовательно, прямое цитотоксическое действие вируса все еще должно рассматриваться как возможный механизм повреждения печени HBV.

Интересно, что болезни печени, вызываемые другими гепадна-вирусами, сильно отличаются от HBV-инфекции. Хотя у сурков с хронической WHV-инфекцией часто встречается активный гепатит умеренной тяжести, у них не бывает цирроза, характерного для людей при HBV-инфекции [164]. У зараженных вирусом GSHV земляных белок гепатиты почти не встречаются [121]. Эти данные могут иметь значение для будущих исследований, целью которых будет выявление роли различных факторов (вирусных, хозяйских или окружающей среды) в патогенезе заболеваний печени, связанных с заражением упоминавшимися выше вирусами. Что касается механизма повреждения клеток печени, то для его выяснения необходимы дополнительные исследования. Если у человека хронический гепатит характеризуется присутствием в крови HBeAg и вирионов, содержащих ДНК и ДНК-полимеразу, а также присутствием в печени HBcAg, то у земляных белок ситуация иная. У этих животных совсем не бывает гепатита или он возникает очень редко, хотя концентрация вирионов, содержащих ДНК и ДНК-полимеразу, в крови намного выше, чем у людей с острыми гепатитами [121, 123]. Таким образом, по крайней мере у земляных белок репликация полновируса не ведет к повреждению клеток печени.

Последний возможный механизм, который необходимо рассмотреть при обсуждении вопроса о повреждении клеток печени во время некоторых HBV-инфекций, по-видимому, уникален и из всех известных вирусных заболеваний человека присущ только заболеваниям, вызываемым HBV. Речь идет о коинфекции вто-

рым цитопатическим вирусом — дельта-агентом, который каким-то образом зависим в своей репликации от HBV. В сыворотках большинства больных с дельта-антигеном в печени содержатся антитела к нему (анти-дельта). В ходе обследования было обнаружено значительное распространение анти-дельта среди итальянцев, живущих как в Италии, так и в других странах, среди наркоманов, вводящих наркотики внутривенно, а также среди носителей HBsAg, которым много раз делали переливание крови [176]. Дельта-антиген не обнаружен у больных, отрицательных по HBsAg, однако в небольших количествах он присутствует у HBsAg-негативных больных, подвергавшихся многократным переливаниям крови, но только у тех, которые имеют анти-HBs. Введение сывороток, содержащих дельта-антиген, не имеющим его шимпанзе — носителям HBsAg, привело к появлению этого антигена в ядрах гепатоцитов этих животных, к исчезновению HBsAg, определявшемуся ранее иммунофлуоресцентным окрашиванием, и к увеличению активности сывороточной аланинаминотрансферазы [174]. Из этих данных следует, что дельта является антигеном дефектного инфекционного агента (дельта-вируса). Его репликация зависит от одновременного заражения HBV. Фенотипическое смешивание ведет к образованию частиц, содержащих дельта-антиген, с оболочками, в которые включен HBsAg, а заражение этими частицами вызывает повреждение печени [175]. Для того чтобы определить, насколько правильна предложенная модель, необходимы дополнительные исследования.

Что касается роли дельта-агента в развитии человеческих гепатитов, то в ранних исследованиях его чаще обнаруживали у больных, положительных по HBsAg с острыми и хроническими гепатитами, чем у бессимптомных носителей [176]. Чисто умозрительно полагали, что тяжелый или молниеносный гепатит чаще развивается при одновременном заражении HBV и дельта-агентом, чем при заражении одним HBV, и случаи молниеносного гепатита В, положительного на дельта-антиген [217], казалось бы, подтверждали это положение, но позже выяснили, что дельта-антиген присутствует только у небольшого числа больных молниеносным гепатитом, по крайней мере в США [217] и Ирландии [194]. Следовательно, для большинства больных молниеносным гепатитом в этих странах дельта-агент не имеет никакого значения. По-видимому, значение дельта-агента возрастает в зонах его более широкого распространения, например в Италии, где было найдено, что он присутствует у 32% носителей HBsAg с хроническим активным гепатитом и у 52% больных циррозом печени, но отсутствует у здоровых носителей HBsAg [217]. Вполне вероятно, что в случае приобретения дельта-инфекции носителями HBsAg [42, 194] у них может происходить обострение гепати-

та, однако необходимо еще установить, всегда ли случаи обострения можно объяснить действием дельта-агента и как влияет последний на тяжесть острого и хронического гепатитов В в США. К сожалению, в настоящее время механизм повреждения печени, связанный с дельта-инфекцией, еще не изучен.

### Первичная гепатоцеллюлярная карцинома (гепатома)

Другой формой заболевания, связанной с хронической HBV-инфекцией, является первичная гепатоцеллюлярная карцинома, или гепатома, причем количество данных, подтверждающих роль HBV в этиологии гепатомы, все увеличивается [16]. В сыворотке большинства больных с гепатомой отмечены низкие титры HBsAg и отсутствие HBeAg, а в клетках печени — редкое присутствие HBsAg [151, 214]. Эти данные свидетельствуют о том, что хронические инфекции, наблюдаемые у таких больных, имеют длительное течение. В связи с тем что в районах с высокой частотой гепатитов HBV-инфекции обычны для очень раннего возраста, возрастное распределение больных с клинически распознаваемыми опухолями позволяет предположить, что опухоли появляются в среднем через 35 лет после заражения HBV [206]. У 60—90% больных гепатомой имеется также сопутствующий цирроз [16, 99, 161, 206, 232], который наряду с персистентной HBV-инфекцией, по-видимому, предрасполагает человека к гепатоцеллюлярной карциноме. Ясно, однако, что цирроз не является необходимым для ее развития.

HBV-инфекция у человека — не единственная гепаднавиральная инфекция, ассоциированная с гепатомой. У сурков, зараженных WHV, гепатомы встречаются чаще [121, 164, 213], чем у людей, зараженных HBV. В неволе гепатома развивается приблизительно у одной трети зараженных в течение года животных, в то время как среди незараженных животных не отмечено развития опухолей. У человека и сурка фоновые заболевания печени и распределение вирусных маркеров в сыворотке различаются. Гепатома развивается у сурков с гистологическими изменениями, характерными для острого и хронического гепатитов, и при высоком уровне полного вируса в крови (но никогда не сопровождается циррозом) [164]. В противоположность этому у человека гепатома обычна при циррозе в отсутствие активного воспалительного процесса, при наличии низких титров HBsAg в сыворотке, когда не регистрируется ни HBeAg, ни вирионная ДНК-полимераза.

В некоторых районах Китая отмечено развитие гепатом в популяциях уток, и в тех же популяциях уток обнаружен гепаднавирус уток, правда, сообщений о прямой корреляции присутствия



вируса и возникновения опухолей не появилось (Summers et al., неопубликованные результаты). В одном исследовании, проведенном в Китае у трех уток, имевших гепатому, не удалось определить ДНК DHV, несмотря на то что нижняя граница чувствительности определения составляла 0,2 копии вирусного генома на клетку. В США аналогичный вирус обнаружен в крови уток на птицефермах [121, 127], однако гепатомы у них не найдено. В течение трех лет наблюдения гепатомы не развились у 24 зараженных GSHV земляных белок, находящихся в неволе [121, 123]. По-прежнему актуальным остается вопрос, какие факторы наиболее важны в распространении рака печени в системах хозяин — гепаднавирус: вирус, хозяин или условия окружающей среды?

В нескольких исследованиях изучали состояние вируса в ткани гепатом человека и сурков и в линиях культуры ткани из гепатом человека. При иммунофлуоресцентном и иммунопероксидазном окрашивании опухолевой ткани было обнаружено, что у больных с HBsAg в крови неопухолевые клетки печени положительны на HBsAg и (или) на HBcAg, тогда как опухолевые клетки чаще всего отрицательны, правда, в некоторых исследованиях сообщается о наличии небольшого количества положительных на HBsAg клеток в опухолях [99]. Еще более редко определялся HBcAg. Таким образом, лишь небольшое количество опухолевых клеток, по-видимому, экспрессирует продукт того или иного вирусного гена в количествах, достаточных для выявления с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания.

В самых ранних исследованиях вирусной ДНК из опухолей [115, 211] в качестве зонда для гибридизации в растворе с ДНК, экстрагированной из ткани гепатомы, использовали радиоактивную вирионную ДНК, полученную в реакции с вирусной ДНК-полимеразой. В некоторых опухолях были найдены последовательности вирусной ДНК при нижней границе чувствительности определения менее одной копии генома вируса на клетку. Как упоминалось выше в разделе «HBV в зараженных клетках и механизм репликации вируса», расщепление рестрикционной эндонуклеазой и блот-анализ по Саузерну [205] позволили предположить, что кроме свободной episомной вирусной ДНК с длиной генома 3200 bp во многих, но не во всех изученных гепатомах определяется интегрированная вирусная ДНК [23, 24, 34, 102, 125, 193, 233]. По полученным данным интеграция происходит в немногих (обычно в 1—4) специфических участках клеточной ДНК в опухолях человека и сурков, но в разных опухолях эти участки различны. Интегрированные вирусные ДНК содержат обширные делеции и перестройки, которые, как и участки соединения вирусной ДНК с клеточной, специфичны для каждой интегрированной вирусной последовательности.

Выявленный блот-анализом по Саузерну характер интеграции ДНК HBV не специфичен для гепатомы; выше, в разделе по репликации вирусов, мы уже обсуждали содержащие эту ДНК высокомолекулярные *Hind* III-фрагменты, которые обнаружены как в препаратах неопухолевой ткани печени при острой [23] и хронической [23, 102, 193] инфекции, так и в препаратах из первичной гепатомы. В препаратах хронически инфицированной печени от разных больных *Hind* III-фрагменты различались. До сих пор не удалось выявить разницы в состоянии вирусной ДНК, интегрированной с ДНК гепатомы и с ДНК неопухолевой ткани печени.

Таким образом, несмотря на явную связь между длительно протекающими гепаднавирусными инфекциями и формированием гепатомы у человека и сурков, а также на обнаружение во многих опухолях вирусной ДНК, интегрированной с клеточной ДНК, пока не ясно, каким образом вирусы принимают участие в развитии первичных гепатом. Роль вирусов должна быть согласована с данными о том, что, во-первых, в некоторых опухолях человека и сурков интегрированная вирусная ДНК не обнаружена; во-вторых, участки интеграции в разных опухолях различны; в-третьих, интегрированная вирусная ДНК в различных опухолях перестроена по-разному.

По крайней мере при поверхностном взгляде гепаднавирусы имеют некоторые общие черты с РНК-содержащими опухолеродными вирусами (ретровирусами), хотя многие свойства HBV и родственных ему вирусов уникальны и характеризуют именно эту группу вирусов. Среди общих черт можно назвать сходство структуры генома, хотя типы нуклеиновых кислот в вирионах этих двух групп вирусов различны: ДНК в случае гепаднавирусов и РНК в случае ретровирусов. Так же как у ретровирусов [236], у гепаднавирусов разделение и репарация липких концов ДНК приводят к образованию линейных молекул с прямыми повторами размером  $\sim 300$  bp в концевых последовательностях [187]. У вирусов обеих групп все вирусные мРНК транскрибируются с одной и той же цепи ДНК и, следовательно, в одном и том же направлении. Кроме того, гепаднавирусная ДНК реплицируется через промежуточную РНК с использованием обратной транскриптазы [133, 210], т. е. по механизму, в некоторой степени аналогичному механизму репликации ретровирусов [236]. При сравнении нуклеотидной последовательности гена обратной транскриптазы ретровирусов и предполагаемой кодирующей последовательности ДНК-полимеразы HBV выявилась значительная гомология [227], что свидетельствует о возможной филогенетической взаимосвязи гепадна- и ретровирусов. Вирусы обеих групп вызывают персистентную инфекцию с сохранением вируса и вирусного антигена в крови в течение многих лет. Четвертой

сходной чертой является склонность вирусов обеих групп к интеграции с клеточной ДНК. Однако пока не доказано, что интеграция гепаднавирусной ДНК — регулярное и обязательное событие в репликации вируса; что вирусный геном в интегрированном состоянии сохраняет свою организацию; что интеграция происходит в специфических участках вирусной ДНК; что интеграция необходима для трансформации клетки. Все перечисленные выше свойства характерны для ретровирусов [236].

Пятой сходной чертой является то, что как в случае гепадна-вирусов [124], так и в случае ретровирусов [181] их ДНК, интегрированная с ДНК зараженных клеток, экспрессирует только ген их оболочечного белка. Шестой сходной чертой является формирование опухолей по крайней мере некоторыми членами каждой группы. Одна из наиболее интересных черт этих вирусов — четкая связь между инфекциями HBV и WHV и образованием гепатомы. Поэтому более детальное исследование роли этих инфекций в формировании опухолей представляет большой интерес. Важно определить, включаются ли вирусные ДНК в участки, прилегающие к онкогенам, и функционируют ли так, как функционируют некоторые ретровирусы, участвуя в трансформации клеток и индукции опухолей [78]; вызывают ли они образование опухоли с помощью механизма «порази и беги» [64]; или они связаны с какими-то другими путями формирования опухолей. Предполагают, что кроме вируса для формирования гепатомы необходимы также некоторые факторы окружающей среды, например химические канцерогены [163], однако пока нет данных, подтверждающих это предположение.

## Литература

1. Albin C., Robinson W. S. (1980). Protein kinase activity in hepatitis B virus, *J. Virol.*, **34**, 297—302.
2. Aldershvile J., Nielsen J. O., Dietrichson O., Hardt F., Juhl E., Tage-Jensen U. (1979). Long-term follow-up of e-antigen (HBeAg) positive acute viral hepatitis, *Scand. J. Gastroenterol.*, **14**, 845—848.
3. Aldershvile J., Skinhoj P., Frosner G. G., Black F., Deinhardt F., Hardt F., Nielsen J. O. (1980). The expression pattern of hepatitis B e and antibody in different ethnic and clinical groups of hepatitis B surface antigen carriers, *J. Infect. Dis.*, **142**, 18—22.
4. Almeida J. D. (1972). Individual morphological variation seen in Australia antigen positive sera, *Am. J. Dis. Child.*, **123**, 303—309.
5. Almeida J. D., Waterson A. P. (1969). Immune complexes in hepatitis, *Lancet*, **2**, 983—986.
6. Almeida J. D., Rubenstein D., Stott E. J. (1971). New antigen antibody system in Australia antigen positive hepatitis, *Lancet*, **2**, 1225—1227.
7. Almeida J. D., Waterson A. P., Trowel J. M., Neale G. (1970). The finding of virus-like particles in two Australia-antigen-positive human livers, *Microbios*, **2**, 145—153.
8. Alter H. J., Blumberg B. S. (1966). Further studies on a «new» human isoprecipitin system (Australia antigen), *Blood*, **27**, 297—309.



9. Alter H. J., Seeff L. D., Kaplan P. M., McAuliffe V. J., Wright E. C., Gerin J., Purcell R. H., Holland P. V., Zimmerman H. J. (1976). Type B hepatitis: the infectivity of blood positive for e antigen and DNA polymerase after accidental needlestick exposure, *N. Engl. J. Med.*, **295**, 909—913.
10. Bancroft W. H., Holland P. V., Mazzur S., Courouce A. M., Madalinski K. (1976). The geographical distribution of HBsAg subtypes, *Bibl. Haematologica* **42**, 42—59.
11. Bancroft W. H., Mundo F. K., Russell P. K. (1972). Detection of additional determinants of hepatitis B antigen, *J. Immunol.*, **109**, 842—848.
12. Barker L. F., Murray R. (1972). Relationship of virus dose of incubation time of clinical hepatitis and time of appearance of hepatitis-associated antigen, *Am. J. Med. Sci.*, **263**, 27—33.
13. Barker L. F., Chisari F. V., Mcgrath P. P., Dalgard D. W., Kirschstein R. L., Almeida J. D., Edgington T. S., Sharp D. G., Peterson M. R. (1973). Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees, *J. Infect. Dis.*, **127**, 648—662.
14. Barkel L. F., Maynard J. E., Purcell R. H. (1975). Hepatitis B virus infection in chimpanzee titration of subtypes, *J. Infect. Dis.*, **134**, 451—458.
15. Bayer M. E., Blumberg B. S., Werner B. (1968). Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis, *Nature*, **218**, 1057—1059.
16. Beasley R. P., Lin C. C., Hwang L., Chien C. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan, *Lancet*, **2**, 1129—1133.
17. Berg R., Bjorling H., Bernsten K., Espmark A. (1972). Recovery of Australia antigen from human plasma products separated by a modified Cohn fractionation, *Vox Sang.*, **22**, 1—13.
18. Black F. L., Hierholzer W. J., Pinheiro F. (1974). Evidence for persistence of infectious agents in isolated human populations, *Am. J. Epidemiol.*, **100**, 230.
19. Blumberg B. S., Alter H. J., Visnich S. (1965). A «new» antigen in leukemia sera, *JAMA*, **191**, 541—546.
20. Blumberg B. S., Gerstley B. J. S., Hungerford D. A., London W. T., Sutnick A. I. (1967). A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome leukemia and hepatitis, *Ann. Intern. Med.*, **66**, 924—931.
21. Bond W. W., Favero M. S., Petersen J. J., Ebert J. W. (1983). Inactivation of hepatitis B virus by intermediate-to-high level disinfectant chemicals, *J. Clin. Microbiol.*, **18**, 535—538.
22. Bond W. W., Favero M. S., Petersen J. J., Gravelle G. R., Ebert J. W., Maynard J. E. (1981). Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week, *Lancet*, **1**, 550—551.
23. Brechot C., Hadchouel M., Scotto J., Fonck M., Potet F., Vyas G. N., Tiollais P. (1981). State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and -negative liver disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3906—3910.
24. Brechot C., Pourcel C., Hadchouel M., Dejean A., Louise A., Scotto J., Tiollais P. (1982). State of hepatitis B virus DNA in liver diseases, *Hepatology*, **2**, 27s—34s.
25. Budkowska A., Kalinowska B., Nowoslawski A. (1979). Identification of two HBsAg subspecificities revealed by chemical treatment and enzymatic digestion of liver-derived HBsAg, *J. Immunol.*, **123**, 1415—1416.
26. Budkowska A., Shih J. W.-K., Gerin J. L. (1977). Immunochemistry and polypeptide composition of hepatitis B core antigen (HBcAg), *J. Immunol.*, **118**, 1300—1350.
27. Burrell C. J. (1975). Host components in hepatitis B antigen, *J. Gen. Virol.*, **27**, 117—126.

28. Burrell C. J., Leadbetter G., Mackay P., Marmion B. P. (1976). Tryptic cleavage of antibody binding sites from hepatitis B surface antigen particles, *J. Gen. Virol.*, **33**, 41—50.
29. Burrell C. J., Mackay P., Greenway P. J., Hofschneider P. H., Murray K. (1979). Expression in *E. coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322, *Nature*, **279**, 43—47.
30. Caramia F., De Bac C., Ricci G. (1972). Virus-like particles within hepatocytes of Australia antigen carriers, *Am. J. Dis. Child.*, **123**, 309—311.
31. Chairez R., Hollinger F. B., Brunschwig J. P., Dreesman G. R. (1975). Comparative biophysical studies of hepatitis B antigen, subtypes adw and ayw, *J. Virol.*, **15**, 182—190.
32. Chairez R., Hollinger F. B., Melnick J. L., Dreesman G. R. (1974). Biophysical properties of purified morphologic forms of hepatitis B antigen, *Intervirology*, **3**, 129—140.
33. Chairez R., Steiner S., Melnick J. L., Dreesman G. R. (1973). Glycoproteins associated with hepatitis B antigen, *Intervirology*, **1**, 224—228.
34. Chakraborty P. R., Ruiz-Opazo N., Shouval D., Shafritz D. A. (1981). Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral DNA in an HBsAg producing human hepatocellular carcinoma cell line, *Nature*, **286**, 532—533.
35. Charnay P., Gervais M., Louise A., Galibert F., Tiollais P. (1980). Biosynthesis of hepatitis B surface antigen in *E. coli*, *Nature*, **286**, 893—895.
36. Charnay P., Mandart E., Hampe A., Fitoussi F., Tiollais P., Galibert F. (1979). Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg), *Nucleic Acids Res.*, **7**, 335—345.
37. Chen D. S., Hoyer B. H., Nelson J., Purcell R. H., Gerin J. L. (1982). Detection and properties of hepatitis B virus DNA in liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, **2**, 42s—46s.
38. Chin T. W., Hollinger F. B., Rich R. R., Troisi C. L., Dreesman G. R., Melnick J. L. (1983). Cytotoxicity by NK-like cells from hepatitis B immune patients to a human hepatoma cells line secreting HBsAg, *J. Immunol.*, **130**, 173—180.
39. Chisari F. V., Bieber M. S., Josepho C. A., Xavier C., Anderson D. S. (1981). Functional properties of lymphocyte subpopulations in hepatitis B virus infection. II. Cytotoxic effector cell killing of targets that naturally express hepatitis B surface antigen and liver-specific lipoprotein, *J. Immunol.*, **126**, 45—49.
40. Chisari F. L., Castle K. L., Xavier C., Anderson D. S. (1981). Functional properties of lymphocyte subpopulations in hepatitis B virus infection. I. Suppressor cell control of T lymphocyte responsiveness, *J. Immunol.*, **126**, 38—44.
41. Chisari F., Routenberg J., Anderson D., Edgington T. (1978). Cellular immune reactivity in HBV-induced liver disease. In: *Viral Hepatitis. Etiology, Epidemiology, Pathogenesis and Prevention*, ed. by G. N. Vyas, S. N. Cohen, and R. S. Schmid, pp. 245—266, Franklin Institute Press, Philadelphia.
42. Columbo M., Cambieri R., Rumi M. G., Ronchi G., Del Ninno E., De Franchis R. (1983). Long-term delta superinfection in hepatitis B surface antigen carriers and its relationship to the course of chronic hepatitis, *Gastroenterology*, **85**, 235—239.
43. Courouze A. M., Holland P. V., Muller J. V., Soulier J. P. (1975). HBsAg antigen subtypes: proceedings of the international workshop on HBs antigen subtypes, *Bibl. Haematologica*, **42**, 1—158.
44. Courouze-Pauty A. M., Plancon A. (1978). a Antigen and anti-e in two categories of chronic carriers of hepatitis B surface antigen, *Vox Sang.*, **34**, 231—238.

45. *Courouce-Pauty A. M., Soulier J. P.* (1974). Further data on HBs antigen subtypes-geographical distribution, *Vox Sang.*, **27**, 533—549.
46. *Dane D. S., Cameron C. H., Briggs M.* (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis, *Lancet*, **2**, 695—698.
47. *Dienstag J. L., Bhan A. K.* (1980). Enhanced in vitro cell-mediated cytotoxicity in chronic hepatitis B virus infection: absence of specificity for virus-expressed antigen on target cell membranes, *J. Immunol.*, **125**, 2269—2276.
48. *Dienstag J., Bhan A., Klingenstein R., Savarese A.* (1982). Immunopathogenesis of liver disease associated with hepatitis B. In: *Viral Hepatitis*, ed. by W. Szmuness, H. Alter, and J. E. Maynards, pp. 221—236, Franklin Institute Press, Philadelphia.
49. *Dreesman G. R., Chairez R., Suarez M., Hollinger F. B., Courtney R. J., Melnick J. L.* (1975). Production of antibody to individual polypeptides derived from purified hepatitis B antigen, *J. Virol.*, **16**, 508—515.
50. *Dreesman G. R., Hollinger F. B., McCombs R. M., Melnick J. L.* (1972). Production of potent anti-Australia antigen sera of high specificity and sensitivity in goats, *Infect. Immun.*, **5**, 213—221.
51. *Dreesman G. R., Hollinger F. B., McCombs R. M., Melnick J. L.* (1973). Alteration of hepatitis B antigen (HBsAg) determinants by reduction and alkylation, *J. Gen. Virol.*, **19**, 129—134.
52. *Dreesman G. R., Hollinger F. B., Melnick J. L.* (1975). Biophysical and biochemical properties of purified preparations of hepatitis B surface antigen (HBsAg), *Am. J. Med. Sci.*, **270**, 123—129.
53. *Dreesman G. R., Sanchez Y., Ionescu-Matiu T., Sparrow J. T., Six H. R., Peterson D. L., Hollinger F. B., Melnick J. L.* (1982). Antibody to hepatitis B surface antigen after a single inoculation of uncoupled synthetic HBsAg peptide, *Nature*, **295**, 158—160.
54. *Eddleston A. L. W. F., Mondelli M., Mieli-Vergani G., Williams R.* (1982). Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection, *Hepatology*, **2**, 122s—127s.
55. *Edgington T. S., Chisari F. V.* (1975). Immunological aspects of hepatitis B virus infection, *Am. J. Med. Sci.*, **270**, 213—227.
56. *Edman J. C., Hallowell R. A., Valenzuela P., Goodman H. M., Rutter W. J.* (1981). Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*, *Nature*, **291**, 503—506.
57. *Eleftheriou N., Heathcoate J., Thomas H. C., Sherlock S.* (1975). Incidence and clinical significance of e antigen and antibody in acute and chronic liver diseases, *Lancet*, **2**, 1171—1173.
58. *Fay O., Tanno H., Roncoroni M., Edwards V. M., Mosley J. W., Redeker A. G.* (1977). Prognostic implications of the e antigen of hepatitis B virus, *JAMA*, **238**, 2501—2503.
59. *Feitelson M. A., Marion P. L., Robinson W. S.* (1981). Antigenic and structural relationships of the surface antigens of hepatitis B virus, ground squirrel hepatitis virus, and woodchuck hepatitis virus, *J. Virol.*, **39**, 447.
60. *Feitelson M. A., Marion P. L., Robinson W. S.* (1982). The core particles of HBV and GSHV. I. Relationship between HBsAg and GSHcAg associated polypeptides by SDS-PAGE and triptic peptide mapping, *J. Virol.*, **43**, 687—696.
61. *Fields H. A., Hollinger F. B., Desmyter J., Melnick J. L., Dreesman G. R.* (1977). Biochemical and biophysical properties of hepatitis B core particles derived from Dane particles and infected hepatocytes, *Intervirology*, **8**, 336—350.
62. *Galibert F., Chen T. N., Mandart E.* (1982). Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence, *J. Virol.*, **41**, 51—65.



63. Galibert F., Mandart E., Fitoussi F., Tiollais P., Charnay P. (1979). Nucleotide sequence of hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*, *Nature*, **281**, 646—650.
64. Galloway D. A., McDougall J. K. (1983). The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a «hit and run» mechanism, *Nature*, **302**, 21—24.
65. Gelfand S. G. (1974). Agammaglobulinemia associated with Australia-antigen positive chronic active hepatitis, *Postgrad. Med.*, **55**, 263—264.
66. Gellis S. J., Neeffe J. R., Stokes J., Jr., Strong L. E., Janeway C. E., Scatchard G. (1948). Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. XXXVI. Inactivation of the virus of homologous serum hepatitis in solution of normal serum albumin by means of heat, *J. Clin. Invest.*, **27**, 239—244.
67. Gerin J. L. (1974). Structure of hepatitis B antigen (HBsAg). In: *Mechanisms of Virus*, ed. by W. S. Robinson and C. F. Fox, pp. 215—224, W. A. Benjamin, Menlo Park.
68. Gerin J. L., Holland P. V., Purcell R. H. (1971). Australia antigen: large scale purification from human serum and biochemical studies of its proteins, *J. Virol.*, **7**, 569—576.
69. Gerin J. L., Shih J. W.-K., McAuliffe V. J., Purcell R. H. (1978). Antigens of the hepatitis B virus: failure to detect HBeAg on the surfaces of HBsAg forms, *J. Gen. Virol.*, **38**, 561—566.
70. Gerlich W. H., Robinson W. J. (1980). Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand, *Cell*, **21**, 801.
71. Gerlich W., Thomssen R. (1975). Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight limits per volume, *Dev. Biol. Stand.*, **30**, 78—87.
72. Gerlin W. H., Feitelson M. A., Marion P. L., Robinson W. S. (1980). Structural relationships between the surface antigens of ground squirrel hepatitis virus and human hepatitis B virus, *J. Virol.*, **36**, 787—795.
73. Goecke D. J. (1975). Extrahepatic manifestations of viral hepatitis, *Am. J. Med. Sci.*, **270**, 49—52.
74. Goecke D. J. (1978). Immune complex phenomena associated with hepatitis. In: *Viral Hepatitis: A Contemporary Assessment of Etiology, Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention*, ed. by G. N. Vyas, S. N. Cohen, and R. Schmid, pp. 277—283, Franklin Institute Press, Philadelphia.
75. Gold J. W. M., Shih J. W.-K., Purcell R. H., Gerin J. L. (1976). Characterization of antibodies to the structural polypeptides of HBsAg: evidence for subtype-specific determinants, *J. Immunol.*, **117**, 1404—1406.
76. Good R. A., Page A. R. (1960). Fatal complications of virus hepatitis in two patients with agammaglobulinemia, *Am. J. Med.*, **29**, 804—810.
77. Gudat F., Bianchi L., Sonnabend W., Thiel G., Aenishaenslin W., Stalder G. A. (1975). Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B, *Lab. Invest.*, **32**, 1—9.
78. Hayward W. S., Neel B. G., Astrin S. M. (1981). Activation of a cellular *onc* gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis, *Nature*, **290**, 475—480.
79. Hess G., Arnold W., Shih J. W.-K., Kaplan P. M., Purcell R. H., Gerin J. L., Meyer zum Bueschenfelde K. H. (1977). Expression of hepatitis B virus-specific markers in asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers, *Infect. Immun.*, **17**, 550—554.
80. Hindman S. H., Gravelle C. R., Murphy B. L., Bradley D. W., Budge W. R., Maynard J. E. (1976). «e» Antigen, Dane particles, and serum DNA polymerase activity in HBsAg carriers, *Ann. Intern. Med.*, **85**, 458, 460.
81. Hoefs J. C., Renner I. G., Ashcavaï M., Redecker A. G. (1980). Hepatitis B surface antigen in pancreatic and biliary secretions, *Gastroenterology*, **79**, 191—194.

82. Hollinger F. B., Dreesman G. R. (1979). Hepatitis B virus antigen and albumin receptors, *Gastroenterology*, **76**, 641—643.
83. Hollinger F. B., Dreesman G. R., Fields H., Melnick J. L. (1975). HBcAg, anti-HBc, and DNA polymerase activity in transfused recipients followed prospectively, *Am. J. Med. Sci.*, **270**, 343—348.
- 83a. Hollinger F. B., Sanchez Y., Troisi C., Dreesman G. R., Melnick J. L. (1984). Response to a HBsAg/adw polypeptide (DP) vaccine in a young adult population. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, ed. by G. N. Vyas, J. L. Dienstag, and J. H. Hoofnagle, p. 656, Grune and Stratton, New York.
84. Hoofnagle J. H. (1980). Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibody (anti-HBs). In: *Virus and the Liver*, ed. by L. Bianchi, W. Gerok, K. Sickinger, and G. A. Staider, pp. 27—37, MTP Press, Lancaster.
85. Hoofnagle J. H., Gerety R. J., Barker L. F. (1973). Antibody to hepatitis B virus core in man, *Lancet*, **2**, 869—873.
86. Hoofnagle J. H., Gerety R. J., Theil J., Barker L. F. (1976). The prevalence of hepatitis B surface antigen in commercially prepared plasma products, *J. Lab Clin. Med.*, **88**, 102—113.
87. Howard C. P., Zuckerman A. J. (1973). Electrofocusing of hepatitis B antigen, *J. Gen. Virol.*, **20**, 254—256.
88. Hruska J. F., Robinson W. S. (1977). The proteins of hepatitis B Dane particle cores, *J. Med. Virol.*, **1**, 119—131.
89. Hruska J. F., Clayton D. A., Rubenstein J. L. R., Robinson W. S. (1977). Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction, *J. Virol.*, **21**, 666—672.
90. Huang S. (1971). Hepatitis-associated antigen hepatitis in electron microscopic study of virus-like particles in liver cells, *Am. J. Pathol.*, **64**, 483—500.
91. Imai M., Yanase Y., Nojiri T., Miyakawa Y., Mayumi M. (1979). A receptor for polymerized human and chimpanzee albumins of hepatitis B virus particles occurring with HBeAg, *Gastroenterology*, **76**, 242—247.
92. Ionescu-Matiu I., Sanchez Y., Hollinger F. B., Melnick J. L., Dreesman G. R. (1980). Presence of a receptor for albumin on individual HBsAg polypeptides and on HBsAg produced by a hepatoma cell line, *J. Med. Virol.*, **6**, 175—178.
93. Johnson P. J., Wansbrough-Jones M. H., Portmann B., Eddleston A. L. W. F., Williams R., Maycock W. D. A., Calne R. Y. (1978). Familial HBsAg positive hepatoma: treatment with orthotopic liver transplantation and specific immunoglobulin, *Br. Med. J.*, **1**, 216.
94. Kam W., Rall L., Schmid R., Rutter W. J. (1982). State of hepatitis B virus in carriers, in acute infection, and in hepatocellular carcinoma. In: *Viral Hepatitis — 1981 International Symposium*, ed. by W. Szmuness, H. J. Alter, and J. E. Maynards, pp. 809, Franklin Institute Press, Philadelphia.
95. Kam W., Rall L., Smuckler E., Schmid R., Rutter W. (1982). Hepatitis B viral DNA in liver and serum of asymptomatic carriers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7522—7526.
96. Kaplan P. N., Ford E. C., Purcell R. H., Gerin J. L. (1976). Demonstration of subpopulations of Dane particles, *J. Virol.*, **17**, 885—893.
97. Kaplan P. N., Greenman R. L., Gerin J. L., Purcell R. H., Robinson W. L. (1973). DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen, *J. Virol.*, **12**, 995—1005.
98. Karasawa T., Tsukagoshi S., Yoshimura M., Sakurai I. (1981). Light microscopic localization of hepatitis B virus antigens in the human pancreas: possibility of multiplication of hepatitis B virus in the human pancreas, *Gastroenterology*, **81**, 998—1005.
99. Kew M. C. (1978). Hepatoma and the HBV. In: *Viral Hepatitis: Etiology, Epidemiology, Pathogenesis and Prevention*, ed. by G. N. Vyas, S. N. Cohen, and R. Schmid, pp. 439—450, Franklin Institute Press, Philadelphia.

100. Kim C. Y., Bissel D. M. (1971). Stability of the lipid and protein of hepatitis-associated (Australia) antigen, *J. Infect. Dis.*, **123**, 470—476.
101. Kim C. Y., Tilles J. G. (1970). Purification and biophysical characterization of hepatitis B antigen, *J. Clin. Invest.*, **52**, 1176—1186.
102. Koshy R., Maupas P., Muller R., Hofschneide P. H. (1981). Detection of hepatitis B virus-specific DNA in the genomes of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis tissues, *J. Gen. Virol.*, **57**, 95—102.
103. Krugman S., Gilles J. P., Hammond J. (1970). Hepatitis virus: effect of heat infectivity and antigenicity of MS-1 and MS-2 strains, *J. Infect. Dis.*, **122**, 432—436.
104. Krugman S., Hoofnagle J. H., Gerety R. J., Kaplan P. M., Gerin J. L. (1974). Viral hepatitis type B: DNA polymerase activity and antibody to hepatitis B core antigen, *N. Engl. Med.*, **290**, 1331—1335.
105. Krugman S., Overby L. R., Mushahwar I. K., Ling C., Frosner G. C., Deinhardt F. (1979). Viral hepatitis, type B: studies on natural history and prevention reexamined, *N. Engl. Med. J.*, **300**, 101—106.
106. Lambert P. H., Tribollet E., Celada A., Madalinski K., Frei P. C., Miescher P. A. (1980). Quantitation of immunoglobulin associated HBs antigen in patients with acute and chronic hepatitis, in healthy carriers and in polyarteritis nodosa, *J. Clin. Lab. Immunol.*, **3**, 1—8.
107. Landers T. A., Greenberg H. B., Robinson W. S. (1977). Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction, *J. Virol.*, **23**, 368—376.
108. Lary G. A., Chisari F. V. (1982). The immunopathogenesis of chronic HBV induced liver disease. In: *Immunological Aspects of Liver Disease*, ed. by H. C. Thomas, P. A. Mescher, and H. J. Mueller-Eberhard, pp. 159—179, Springer-Verlag, Berlin.
109. LeBouvier G. L. (1971). The heterogeneity of Australia antigen, *J. Infect. Dis.*, **123**, 671—675.
110. LeBouvier G. L. (1972). Seroanalysis by immunodiffusion: the subtypes of type B hepatitis virus. In: *Hepatitis and Blood Transfusion*, ed. by G. N. Vyas, A. Perkins, and R. Schmid, pp. 97—109, Grune and Stratton, New York.
111. LeBouvier G. L., McCollum R. W. (1970). Australia (hepatitis associated) antigen: physicochemical and immunological characteristics, *Adv. Virus Res.*, **16**, 357—396.
112. Lee W. M., Reed W. O., Osman C. G., Vahram O. J., Zuckerman A. J., Eddleston A. L. W. F., Williams R. (1977). Immune responses to the hepatitis B surface antigen and liver-specific lipoprotein in acute type B hepatitis, *Gut.*, **18**, 250—257.
113. Lerner R. A., Green N., Alexander H., Liu F. T., Sutcliffe J. G., Schinick T. M. (1981). Chemically synthesized particles predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3403—3407.
114. London W. T., DiFiglia M., Sutnick A. I., Blumberg B. S. (1969). An epidemic of hepatitis in a chronic hemodialysis unit, *N. Engl. J. Med.*, **281**, 571—578.
115. Lutwick L. I., Robinson W. S. (1977). DNA synthesized in the hepatitis B Dane particle DNA polymerase reaction, *J. Virol.*, **21**, 96—104.
116. Macnab G. G., Alexander J. J., Lecatsas G., Bey E. M., Urbanowicz J. M. (1976). Hepatitis B surface antigen produced by a human hepatoma cell line, *Br. J. Cancer*, **34**, 509—615.
117. Madalinski K., Bragiel I. (1979). HBsAg immune complexes in the course of infection with hepatitis B virus, *Clin. Exp. Immunol.*, **36**, 371—378.
118. Magnus L. O. (1975). Characterization of a new antigen-antibody system associated with hepatitis B, *Clin. Exp. Immunol.*, **20**, 209—216.



119. *Magnius L. O., Espmark J. A.* (1972). New specificities in Australia antigen-positive sera distinct from LeBouvier determinants, *J. Immunol.*, **109**, 1017—1021.
120. *Magnius L. O., Lindholm A., Lundin P., Iwarson S.* (1975). A new antigen-antibody system: clinical significance in long term carriers of hepatitis B surface antigen, *JAMA*, **231**, 356—359.
121. *Marion P. L., Robinson W. S.* (1983). Hepadna viruses: hepatitis B and related viruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*
122. *Marion P. L., Knight S. S., Feitelson M. A., Oshiro L. S., Robinson W. S.* (1984). The major polypeptide of duck hepatitis B surface antigen particles, *J. Virol.* (in press).
123. *Marion P. L., Oshiro L., Regnery D. C., Scullard G. H., Robinson W. S.* (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of man, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2941—2945.
124. *Marion P. L., Salazar F. H., Alexander J. J., Robinson W. S.* (1979). Polypeptides of hepatitis B surface antigen produced by a hepatoma cell line, *J. Virol.*, **32**, 796—802.
125. *Marion P. L., Salazar F. H., Alexander J. J., Robinson W. S.* (1980). State of hepatitis B viral DNA in a human hepatoma cell line, *J. Virol.*, **33**, 795—806.
126. *Mason W. S., Aldrich C., Summers J., Taylor J. M.* (1982). Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells (free minus-strand DNA), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3997—4001.
127. *Mason W. S., Seal G., Summers J.* (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus, *J. Virol.*, **36**, 829—836.
128. *Maynard J. E.* (1963). Infectious hepatitis at Ford Yukon, Alaska — report of an outbreak, *Am. J. Public Health*, **53**, 31—39.
129. *Mazzur S., Burgent S., Blumberg B. S.* (1974). Geographical distribution of Australia antigen determinants d, y and w, *Nature*, **247**, 38—40.
130. *McCullum R. W.* (1952). The size of serum hepatitis virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **81**, 157—160.
131. *Miller R. H., Robinson W. S.* (1983). Integrated hepatitis B virus DNA sequences specifying the major viral core polypeptide are methylated in PLC/PRF/5 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2534—2538.
132. *Miller R. H., Robinson W. S.* (1984). Hepatitis B viral DNA forms in infected liver, *J. Virol.* (in press).
133. *Miller R. H., Robinson W. S.* (1984). Hepatitis B virions from plasma and particles from liver of infected patients synthesize DNA of DNA—RNA hybrid molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press).
134. *Miller D. J., Williams A. E., LeBouvier G. L., Dwyer J. M., Grant J., Klat-skin G.* (1978). Hepatitis B in hemodialysis patients: significance of HBeAg, *Gastroenterology*, **74**, 1208—1213.
135. *Millman I., Hutanen H., Merino F., Bayer M. E., Blumberg B. S.* (1971). Australia antigen: physical and chemical properties, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **2**, 667—686.
136. *Mitamura K., Hoyer B. H., Ponzetto A., Nelson J., Purcell R. H., Gerin J. L.* (1982). Woodchuck hepatitis virus DNA in woodchuck liver tissue, *Hepatology*, **2**, 47s—50s.
137. *Miyakawa Y., Mayumi M.* (1982). HBeAg-anti-HBe system in hepatitis B virus infection. In: *Viral Hepatitis — 1981 International Symposium*, ed. by W. Szmuness, H. J. Alter, and J. E. Maynard, pp. 183—194, Franklin Institute Press, Philadelphia.
138. *Mosley J. W., Edwards V. M., Meihaus J. E., Redeker A. G.* (1972). Subdeterminants d and y of hepatitis B antigen as epidemiological markers, *Am. J. Epidemiol.*, **95**, 529—535.

139. *Moussourous A., Cochrane A. M. G., Thomson A. O., Eddleston A. L., Williams R.* (1975). Transient lymphocyte-mediated hepatotoxicity in acute viral hepatitis, *Gut*, **16**, 835—836.
140. *Murphy B. L., Peterson J. M., Ebert J. W., Berquist K. R., Maynard J. E., Purcell R. H.* (1975). Immunofluorescent localization of hepatitis B antigens in chimpanzee tissues, *Intervirology*, **6**, 207—211.
141. *Murray R., Dieffenbach W. C.* (1953). Effect of heat on the agent of homologous serum hepatitis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**, 230—231.
142. *Neurath A. R., Strick N.* (1979). Association of hepatitis B e-antigen (HBeAg) determinants with the core of Dane particles, *J. Gen. Virol.*, **42**, 645—649.
143. *Neurath A. R., Strick N.* (1979). Radioimmunoassay for albumin-binding sites associated with HBsAg: correlation of results with the presence of e-antigen in serum, *Intervirology*, **11**, 128—132.
144. *Neurath A. R., Hashimoto N., Prince A. M.* (1978). Sialyl residues in hepatitis B antigen: their role in determining the life span of the antigen in serum and in eliciting an immunological response, *J. Gen. Virol.*, **27**, 81—91.
145. *Neurath A. R., Prince A. M., Giacalone J.* (1978). Large scale purification of hepatitis B surface antigen using affinity chromatography, *Experimentia*, **34**, 414—415.
146. *Neurath A. R., Prince A. M., Lippin A.* (1974). Hepatitis B antigen: antigenic site related to human serum proteins revealed by affinity chromatography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2663—2667.
147. *Neurath A. R., Strick N., Huang C. Y.* (1978). Properties of delipidated hepatitis B surface antigen (HBsAg) and preparation of its proteolytic cleavage fragments carrying HBsAg-specific antigenic determinants, *Intervirology*, **10**, 265—275.
148. *Neurath A. R., Szmuness W., Stevens C. E., Strick N., Harley E. J.* (1978). Radioimmunoassay and some properties of human antibodies to hepatitis B core antigen, *J. Gen. Virol.*, **38**, 549—559.
149. *Neurath A. R., Trepo C., Chen M., Prince A. M.* (1976). Identification of additional antigenic sites on Dane particles and the tubular forms of hepatitis B surface antigen, *J. Gen. Virol.*, **30**, 277—285.
150. *Nielson J. D., Dietrichson O., Juhl E.* (1974). Incidence and meaning of the «e» determinant among hepatitis-B-antigen positive patients with acute and chronic liver diseases, *Lancet*, **2**, 913—915.
151. *Nishioka K., Hirayama T., Sekine T., Okochi K., Mayumi M., Jueilow S., Chen-Chui L., Tong-Min L.* (1973). Australia antigen and hepatocellular carcinoma, *Gann*, **14**, 167.
152. *Nishioka K., Levin A. G., Simons M. J.* (1975). Hepatitis B antigen, antigen subtypes, and hepatitis B antibody in normal subjects and patients with liver disease, *Bull. WHO*, **52**, 293—300.
153. *Nordenfeldt E., Andren-Sandberg M.* (1976). Dane particle associated DNA polymerase and e antigen: relation to chronic hepatitis among carriers of hepatitis B surface antigen, *J. Infect. Dis.*, **134**, 85—89.
154. *Nordenfeldt E., Lindholm T., Dahlquist E.* (1970). A hepatitis epidemic in a dialysis unit: occurrence and persistence of Australia-antigen among patients and staff, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **78**, 692—700.
155. *Nowoslawski A., Krawczynski K., Brzosko W. J.* (1972). Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis, *Am. J. Pathol.*, **68**, 31—48.
156. *Ogston C. W., Jonak G. J., Rogler C. E., Astrin S. M., Summers J.* (1982). Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinomas of woodchucks, *Cell*, **29**, 385—394.
157. *Otori H., Onodera S., Ishida N.* (1979). Demonstration of hepatitis B e anti-

- gen (HBsAg) in association with intact Dane particles, *J. Gen. Virol.*, **43**, 423—427.
158. *Okochi K., Murakami S.* (1968). Observations on Australia antigen in Japanese *Vox Sang.*, **15**, 374—385.
  159. *Perrillo R. P., Gelb L., Campbell C. C., Wellingshoff W., Ellis F. R., Overby L., Aach R. D.* (1979). Hepatitis B e antigen, DNA polymerase activity, and infection of household contacts with hepatitis B virus, *Gastroenterology*, **76**, 1319—1325.
  160. *Peters R. L.* (1975). Viral hepatitis: a pathologic spectrum, *Am. J. Med. Sci.*, **270**, 17—31.
  161. *Peters R.* (1976). Pathology of hepatocellular carcinoma. In: *Hepatocellular Carcinoma*, ed. by K. Okuda and R. L. Peters, pp. 107—168, Wiley, New York.
  162. *Peterson D. L., Chien D. Y., Vyas G. N., Nitecki D., Bond H. E.* (1978). Characterization of polypeptides of HBsAg for the proposed «UC Vaccine» for hepatitis B. In: *Viral Hepatitis: A Contemporary Assessment of Etiology, Epidemiology, Pathogenesis and Prevention*, ed. by G. N. Vyas, S. N. Cohen, and R. Schmid, pp. 569—573, Franklin Institute Press, Philadelphia.
  163. *Popper H.* (1978). Considerations on an association between hepatocellular carcinoma and hepatitis B. In: *Viral Hepatitis*, ed. by G. N. Vyas, S. N. Cohen, and R. S. Schmid, pp. 451—454, Franklin Institute Press, Philadelphia.
  164. *Popper H., Shih J. W. K., Gerin J. L., Wong D. C., Hoyer B. H., London W. T., Sly D. L., Purcell R. H.* (1981). Woodchuck hepatitis and hepatocellular carcinoma: correlation of histologic with virologic observations, *Hepatology*, **1**, 91—98.
  165. *Prince A. M.* (1968). An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**, 814—821.
  166. *Prince A. M., Ikram H., Hopp T. P.* (1982). Hepatitis B virus vaccine: identification of HBsAg/a and HBsAg/d but not HBsAg/y subtype antigenic determinants on a synthesis immunogenic peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 579—582.
  167. *Prince A. M., Stephan W., Brotman B.* (1983).  $\beta$ -Propranolol/ultraviolet irradiation: a review of its effectiveness for inactivation of viruses in blood derivatives, *Rev. Infect. Dis.*, **5**, 92—107.
  168. *Purcell R. H., Gerin J. L.* (1975). Hepatitis B subunit vaccine: a preliminary report of safety and efficacy tests in chimpanzees, *Am. J. Med. Sci.*, **270**, 395—399.
  169. *Ray M. B., Desmet V. J., Bradburne A. F., Desmyter J., Fevery J., De-Groote J.* (1976). Differential distribution of hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in the liver of hepatitis B patients, *Gastroenterology*, **71**, 462—469.
  170. *Realdi G., Alberti A., Rugge M., Bortolotti F., Rigoli A. M., Tremolada F., Rual A.* (1980). Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B virus infection, *Gastroenterology*, **79**, 195—199.
  171. *Robinson W. S.* (1977). The genome of hepatitis B virus, *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 357—377.
  172. *Robinson W. S.* (1980). Genetic variation among hepatitis B and related viruses, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **354**, 371—378.
  173. *Robinson W. S., Greenman R. L.* (1974). DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate, *J. Virol.*, **13**, 1231—1236.
  174. *Robinson W. S., Lutwick L. I.* (1976). Hepatitis B virus: a cause of persistent virus infection in man. In: *Animal Virology*, ed. by D. Baltimore, A. Huang, and C. F. Fox, pp. 787—811, Academic Press, New York.
  175. *Robinson H. L., Astrin S. M., Senior A. M., Salazar F. H.* (1981). Host susceptibility to endogenous viruses: defective glycoprotein-expressing provirus interfere with infection, *J. Virol.*, **40**, 745—751.



176. Robinson W. S., Clayton D. A., Greenman R. L. (1974). DNA of a human hepatitis B virus candidate, *J. Virol.*, **14**, 384—391.
177. Robinson W. S., Marion P. L., Feitelson M., Siddiqui A. (1982). The hepadna virus group: hepatitis B and related viruses. In: *Viral Hepatitis—1981 International Symposium*, ed. by W. Szmunes, H. J. Alter, and J. W. Maynard, pp. 57—68, Franklin Institute Press, Philadelphia.
178. Redeker A. G., Hopkins C. E., Jackson B., Peck P. (1968). A controlled study of the safety of pooled plasma stored in the liquid state at 30—32 C for 6 months, *Transfusion*, **8**, 60—64.
179. Redeker A. G., Mosley J. W., Gocke D. J., McKee A. P., Pollack W. (1975). Hepatitis B immune globulin as a prophylactic measure for spouses exposed to acute type B hepatitis, *N. Engl. J. Med.*, **293**, 1055—1059.
180. Reinicke V., Dybkjaer E., Poulsen H., Banke O., Lylloff F. K., Nordenfelt E. (1972). A study of Australia-antigen-positive blood donors and their recipients, with special reference to liver histology, *N. Engl. J. Med.*, **286**, 867—870.
181. Rizzetto M., Canese M. G., Gerin J. L., London W. T., Sly O. L., Purcell R. H. (1980). Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees, *J. Infect. Dis.*, **141**, 590—602.
182. Rizzetto M., Hoyer B., Canese M. G., Shih J. W. K., Purcell R. H., Gerin J. L. (1980). Delta agent: the association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and ribonucleic acid in the serum of delta-infected chimpanzees, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6124—6128.
183. Rizzetto M., Purcell R. H., Gerin J. L. (1980). Epidemiology of HBV-associated delta agent: geographical distribution of anti-delta and prevalence in polytransfused HBsAg carriers, *Lancet*, **1**, 1215—1218.
184. Romet-Lemonne J.-L., McLane M. F., Elfassi E., Haseltine W. A., Azocar J., Essex M. (1983). Hepatitis B virus infection in cultured human lymphoblastoid cells, *Science*, **221**, 667—669.
185. Salaman M. H., Williams D. L., King A. J., Nico C. S. (1944). Prevention of jaundice resulting from antisyphilitic treatment, *Lancet*, **2**, 7—8.
186. Sanchez Y., Ionescu-Matiu I., Hollinger F. B., Melnick J. L., Dreesman G. R. (1980). Antigenic relationship of a hepatitis B surface antigen-derived polypeptide and human serum albumin, *J. Gen. Virol.*, **48**, 273—283.
187. Sattler F. R., Robinson W. S. (1979). Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends, *J. Virol.*, **32**, 226—233.
188. Schroeder D. D., Mozen M. M. (1970). Australia antigen: distribution during Cohn cold ethanol fractionation of human plasma, *Science*, **168**, 1462—1464.
189. Schweitzer I. L., Dunn A. E. G., Peters R. L., Spears R. L. (1973). Viral hepatitis B in neonates and infants, *Am. J. Med.*, **55**, 762—771.
190. Scullard G. H., Greenberg H. B., Smith J. L., Gregory P. G., Merigan T. C., Robinson W. S. (1982). Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infection: infectious virus cannot be detected in patient serum after permanent responses to treatment, *Hepatology*, **2**, 39—49.
191. Seeff L. B., Zimmerman H. J., Wright E. C., Finkelstein D. J., Greenlee H. B., Hamilton J., Leevy C. M., Tamburrow C. H., Vlahcevi A., Zimmon D. S., Felsher B. F., Garcia-Pont P., Dietz A. A., Koff R. S., Kierman I., Schiff E. R., Zemel R., Nath N. (1975). Efficacy of hepatitis B immune serum globulin after accidental exposure: preliminary report of the Veterans Administration cooperative study, *Lancet*, **2**, 939—941.
192. Shafritz D. A. (1982). Hepatitis B virus DNA molecules in the liver of HBsAg carriers: mechanistic considerations in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, **2**, 35S—41S.
193. Shafritz D. A., Shouval D., Sherman H., Hadziyannis S., Kew M. (1981). Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma, *N. Engl. J. Med.*, **305**, 1067.

194. Shattock A. G., Morgan B. M., Peutherer J., Inglis M. J., Fielding J. F., Kelly M. G. (1983). High incidence of delta antigen in serum, *Lancet*, 2, 104—105.
195. Shih J. W.-K., Gerin J. L. (1975). Immunochemistry of hepatitis B surface antigen (HBsAg): preparation and characterization of antibodies to the constituent polypeptides, *J. Immunol.*, **115**, 634—639.
196. Shih J. W.-K., Gerin J. L. (1977). Proteins of hepatitis B surface antigen, *J. Virol.*, **21**, 347—357.
197. Shih J. W.-K., Gerin J. L. (1977). Proteins of hepatitis B surface antigen: amino acid composition of the major polypeptides, *J. Virol.*, **21**, 1219—1222.
198. Shih J. W.-K., Tan P. L., Gerin J. L. (1980). Relationship of large hepatitis B surface antigen polypeptide to human serum albumen, *Infect. Immun.*, **28**, 459—463.
199. Shikata T. (1973). Australia antigen in liver tissue, *Jpn. J. Exp. Med.*, **43**, 231—245.
200. Shikata T., Karasawa T., Abe K., Takahashi T., Mayumi M., Oda T. (1978). Incomplete inactivation of hepatitis B virus after heat treatment at 60°C for 10 hours, *J. Infect. Dis.*, **138**, 242—244.
201. Shikata T., Karasawa T., Abe K., Uzqwa T., Suzuki H., Oda T., Imai M., Mayumi M., Mortisuga Y. (1977). Hepatitis B e antigens and infectivity of hepatitis B virus, *J. Infect. Dis.*, **136**, 571—576.
202. Siddiqui A., Sattler F. R., Robinson W. S. (1979). Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus, subtype adw<sub>2</sub>, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4664—4668.
203. Smith J. L., Murphy B. L., Auslander M. D., Maynard J. E., Schalm S. S., Summerskill W. H., Gitnick G. L. (1976). Studies of the «e» antigen in acute and chronic hepatitis, *Gastroenterology*, **71**, 208—209.
204. Soulier J. P., Biatix C., Courouce A. M., Benamon-Djiane D., Amouch P., Drouet J. (1972). Prevention of virus B hepatitis (SH virus), *Am. J. Dis. Child.*, **123**, 429—434.
205. Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, **98**, 503—517.
206. Steiner P. E. (1960). Cancer of the liver and cirrhosis in trans-Saharan Africa and the United States of America, *Cancer*, **13**, 1085—1139.
207. Steiner S., Huebner M. T., Dreesman G. R. (1974). Major polar lipids of hepatitis B antigen preparations: evidence for the presence of glycosphingolipid, *J. Virol.*, **14**, 572—577.
208. Struck D. K., Lennarz W. J., Brew K. (1978). Primary structural requirements for the enzymatic formation of the N-glycosidic bond in glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **253**, 5786—5794.
209. Sukeno N., Shirachi R., Yamaguchi J., Ishida N. (1972). Reduction and reoxidation of Australia antigen: loss and reconstitution of particle structure and antigenicity, *J. Virol.*, **9**, 182—183.
210. Summers J., Mason W. S. (1982). Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate, *Cell*, **29**, 403—415.
211. Summers J., O'Connell A., Maupas P., Goudeau A., Coursaget P., Drucker J. (1978). Hepatitis B virus DNA in primary hepatocellular carcinoma tissue, *J. Med. Virol.*, **2**, 207—214.
212. Summers J. A., O'Connell A., Millman I. (1975). Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4597—4601.
213. Summers J., Smolec J. M., Snyder R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4533—4537.

214. *Szmuness W.* (1978). Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association, *Prog. Med. Virol.*, **24**, 40—69.
215. *Szmuness W., Stevens C. E., Harley E. J., Zang E. A., Oleszko W. R., William D. C., Sadovsky R., Morrison J. M., Kellner A.* (1980). Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States, *N. Engl. J. Med.*, **303**, 833—841.
216. *Tabor E., Gerety R. J., Barker L. F.* (1977). Detection of e antigen during acute and chronic hepatitis B virus infections in chimpanzees, *J. Infect. Dis.*, **136**, 541—547.
217. *Tabor E., Ponzetto A., Gerin J. L., Gerety R. J.* (1983). Does delta agent contribute to fulminant hepatitis? *Lancet*, **1**, 765—766.
218. *Takahashi K., Akahane Y., Gotanda T., Mishiro T., Imai M., Miyakawa Y., Mayumi M.* (1979). Demonstration of hepatitis e antigen in the core of Dane particles, *J. Immunol.*, **122**, 275—279.
219. *Takahashi K., Fukuda M., Baba K., Imai M., Miyakawa Y., Mayumi M.* (1977). Determination of e antigen and antibody to e by means of passive hemagglutination method, *J. Immunol.*, **119**, 1556—1559.
220. *Takahashi K., Imai M., Gotanda T., Oinuma A., Mishiro S., Miyakawa Y., Mayumi M.* (1980). Hepatitis B e antigen isolated from sera of individuals infected with hepatitis B virus: comparison with HBeAg polypeptide derived from Dane particles, *J. Gen. Virol.*, **50**, 49—57.
221. *Takahashi K., Imai M., Miyakawa Y., Iwakiri S., Mayumi J.* (1978). Duality of hepatitis B e antigen in serum of persons infected with hepatitis B virus: evidence for non-identity of e antigen and immunoglobulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1952—1956.
222. *Takahashi K., Imai M., Tsuda F., Takahashi T., Miyakawa Y., Mayumi M.* (1976). Association of Dane particle with e antigen in the serum of asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen, *J. Immunol.*, **117**, 102—105.
223. *Takahashi K., Miyakawa Y., Gotanda T., Mishiro S., Imai M., Mayumi M.* (1979). Shift from free «small» hepatitis B e antigen to IgG-bound «large» form in the circulation of human beings and a chimpanzee acutely infected with hepatitis B virus, *Gastroenterology*, **77**, 1193—1199.
224. *Takahashi K., Yamashita S., Imai M., Miyakawa Y., Mayumi M.* (1978). Failure of antibody to e antigen to precipitate Dane particles containing DNA polymerase activity and hepatitis B core antigen, *J. Gen. Virol.*, **38**, 431.
225. *Tedder R. S., Bull F. G.* (1979). Characterization of «e» antigen associated with hepatitis B, *Clin. Exp. Immunol.*, **35**, 380—389.
226. *Thomssen R., Gerlich W., Stamm B., Biswas R., Lorenz P. R., Majer M., Weinmann E., Arnold W., Hess G., Wepler W., Linde O.* (1977). Infectivity of purified hepatitis virus particles, *N. Engl. J. Med.*, **296**, 396.
227. *Toh H., Hayashida H., Miyata T.* (1983). Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus, *Nature*, **305**, 827—829.
228. *Tong M. I., Thursby M., Rakela J., McPeak C., Edwards V. M., Mosley J. W.* (1981). Studies on the material-infant transmission of the viruses which cause acute hepatitis, *Gastroenterology*, **80**, 999—1004.
229. *Trepo C., Hantz O., Jacquier M. F., Nemoz G., Cappel R., Trepo D.* (1978). Different fates of hepatitis B virus markers during plasma fractionation: a clue to the infectivity of blood derivatives, *Vox Sang.*, **35**, 143—148.
230. *Trepo C. G., Magnus L. O., Schaefer R. A., Prince A. M.* (1976). Detection of e antigen and antibody: correlations with hepatitis B surface and hepatitis B core antigen, liver disease, and outcome in hepatitis B infections, *Gastroenterology*, **71**, 804—808.
231. *Trevisan A., Realdi G., Alberti A., Ongaro G., Pornaro E., Meliconi R.* (1982). Core antigen-specific immunoglobulin G bound to the liver cell membrane in chronic hepatitis B, *Gastroenterology*, **82**, 218—222.



232. *Trichopoulos D., Violaki M., Sparros L., Xirouchaki E.* (1975). Epidemiology of hepatitis B and primary hepatic carcinoma, *Lancet*, 2, 1038—1039.
233. *Twist E. M., Clark H. F., Aden D. P., Knowles B. B., Plotkin S. A.* (1981). Integration pattern of hepatitis B virus DNA sequences in human hepatoma cell lines, *J. Virol.*, 37, 239—243.
234. *Valenzuela P., Gray P., Quiroga M., Zaldivar J., Goodman H. M., Rutter W. J.* (1979). Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of the hepatitis B surface antigen, *Nature*, 280, 815—819.
235. *Valenzuela P., Quiroga M., Zaldivar J., Gray P., Rutter W. J.* (1980). The nucleotide sequence of the hepatitis B genome and the identification of the major viral genes, In: *Animal Virus Genetics*, ed. by B. Fields, R. Jaenisch, C. F. Fox, pp. 57—70, Academic Press, New York.
236. *Varmus H., Swanstrom R.* (1982). Replication of retroviruses. In: *RNA Tumor Viruses*, ed. by R. Weiss, N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin, pp. 369—512, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
237. *Vyas G. N.* (1981). Molecular immunology of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). In: *Hepatitis B vaccine*, ed. by P. Munpas and P. Guesry, pp. 227—237, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
238. *Vyas G. N., Rao K. B., Ibrahim A. B.* (1972). Australia antigen (hepatitis B antigen): a conformational antigen dependent on disulfide bonds, *Science*, 187, 1300—1301.
239. *Vyas G. N., Williams E. W., Klaus G. G. B., Bond H. E.* (1972). Hepatitis-associated Australia antigen: protein, peptides, and amino acid composition of purified antigen with its use in determining sensitivity of the hemagglutination test, *J. Immunol.*, 108, 1114—1118.
240. *Werner B. G., Smolec J. M., Snyder R., Summers J.* (1979). Serologic relationship of woodchuck hepatitis virus and human hepatitis B virus, *J. Virol.*, 32, 314—322.
241. *Wewalka F.* (1953). Zur epidemiologie des ikterus bei der antisypilitischen behandlung, *Schweiz Z. Allg. Pathol.*, 16, 307—312.
242. *Williams A., LeBouvier G.* (1976). Heterogeneity and thermolability of «e», *Bibl. Haematologica*, 42, 71—75.
243. *Zhou Y-Z.* (1980). A virus possibly associated with hepatitis and hepatoma in ducks, *Shanghai Inst. Biochem. Acad. Sinica*, 3, 641—644.

## Вирусы Т-клеточных лейкозов человека

*М. Г. Сарнгадхаран, П. Д. Маркхэм, Р. Галло<sup>1</sup>*

### Часть I: HTLV-I и HTLV-II

#### ИСТОРИЯ ВОПРОСА

Последние 5—6 лет мы стали свидетелями появления новой ветви ретровирусологии — открытия, выделения и характеристики семейства лимфотропных ретровирусов человека, этиологически связанных с болезнями, находящимися на разных концах спектра Т-клеточных болезней человека. Эти вирусы представляют собой единственные известные к настоящему времени ретровирусы человека, достоверно связанные с заболеваниями. Ранние трудности выделения ретровирусов из тканей человека резко контрастировали с тем, что наблюдалось у животных. Для большинства лейкозов животных характерна интенсивная репликация ретровирусов, и выделение ретровирусов от этих животных было относительно простым делом. Однако лейкозы человека не связаны с виремией, и поэтому возможность выделять ретровирусы из материала, взятого от человека, появилась только после разработки методов культивирования лейкозных клеток. Двумя основными причинами ранних неудач были непонимание того, какие индивидуальные клетки или ткани надо исследовать, чтобы выделить вирус, и неумение выращивать *in vitro* соответствующие клетки человека.

В результате важных достижений в области биохимии ретровирусов и биологии Т-клеток человека в период от начала до середины 70-х годов удалось выделить несколько представителей класса ретровирусов человека, которых называли вирусами лейкоза или лимфомы человека (HTLV, от англ. human T-leukemia/lymphoma viruses). Сначала разработали несколько чувствительных методов определения активности обратной транскриптазы ретровирусов, позволивших отличать ее от клеточной ДНК-полимеразы [138], но ключевым достижением было открытие в кондиционированной среде культур лимфоцитов, стимулированных лектином (или антигеном), белкового фактора, названного Т-кле-

<sup>1</sup> *M. G. Sarngadharan, P. D. Markham, Department of Cell Biology, Litton Bionetics, Inc., Kensington, Maryland 20895; R. C. Gallo, Laboratory of Tumor Cell Biology, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland 20205.*

точным фактором роста (ТКФР) или интерлейкином-2 [102, 131]. Тщательное наблюдение за активностью обратной транскриптазы в полученных с помощью ТКФР культурах неопластических Т-клеток человека привело к открытию HTLV типа I (HTLV-I). В этой главе мы дадим краткий обзор системы размножения Т-клеток человека, рассмотрим некоторые детали выделения и определения свойств ретровирусов человека, а также имеющиеся в настоящее время эпидемиологические, биологические и молекулярно-биологические данные, указывающие на их связь с заболеваниями человека.

### Т-клеточный фактор роста и размножение Т-клеток

Как известно с 1960 г., лимфоциты периферической крови человека после стимуляции растительным лектином фитогемагглютинином (ФГА) могут претерпевать бласт-трансформацию [104]. В дальнейшем выяснилось, что при определенных условиях способностью вызывать деление Т-клеток обладают также специфические антигены. Несмотря на то что в результате стимуляции начинается синтез новых ДНК, РНК и белков, а Т-клетки проходят несколько циклов пролиферации, под действием лектина или антигена не удавалось достичь постоянного размножения Т-клеток. В начале 70-х годов было установлено, что среда, собранная из этих культур лимфоцитов (кондиционированная), содержит большое количество гемопоэтических факторов, стимулирующих рост [118]. Среди них был белковый фактор, поддерживающий размножение предварительно активированных лектином или антигеном лимфоцитов. Этот белок первоначально был назван Т-лимфоцитарным ростовым фактором, а в дальнейшем его переименовали в Т-клеточный фактор роста (ТКФР), хотя он больше известен как интерлейкин-2 (ИЛ-2) [102, 131].

Стало ясно, что стимуляция антигеном или лектином обеспечивает начальную ступень пролиферативного ответа Т-клеток. После стимуляции одни Т-клетки формируют рецепторы для ТКФР, другие производят сам ТКФР. Для продукции ТКФР необходимы новотранскрибированная мРНК и синтез белка [18]. Новосинтезированный ТКФР взаимодействует с клетками, несущими рецепторы ТКФР, способствуя размножению этих клеток. Таким образом, истинным стимулом для пролиферации является ТКФР, а не антиген или лектин. Последние играют роль исходных сигналов и обеспечивают специфичность реакции.

Первым был охарактеризован частично очищенный ТКФР из нормальных лейкоцитов [97], который затем удалось очистить до



гомогенного состояния [88]. Это белок с мол. массой 15К, обладающий незначительной видовой специфичностью, у которого сильно выражена специфичность к относительно зрелым активированным клеткам Т-клеточного происхождения. Ген ТКФР человека был клонирован [18, 160], а затем экспрессирован в бактериях. Регуляция экспрессии этого гена, представленного одной копией без полиморфизма, осуществляется главным образом, если не исключительно, на уровне транскрипции [18].

С самых первых опытов стало ясно, что ТКФР не связывается с нормальными лимфоцитами человека и не стимулирует их пролиферации, если их предварительно не активировать лектинами или антигенами. Эти клетки способны синтезировать рецепторы ТКФР только после активации. Большинство здоровых людей не имеют сколько-нибудь значительной популяции Т-клеток, несущих рецепторы ТКФР. Когда для изучения пролиферации неопластических Т-клеток, полученных от больных с различными формами Т-клеточных новообразований, стали использовать частично очищенный ТКФР, выяснили, что в отличие от нормальных клеток клетки многих больных непосредственно реагируют на ТКФР [50, 109]. Другими словами, эти клетки экспрессируют поверхностные рецепторы ТКФР без предварительной активации *in vitro*. В дальнейшем этот результат был подтвержден при изучении связывания очищенного ТКФР с клетками [123, 124]. Ушияма и др. [164] получили моноклональные антитела к поверхностным антигенам активированных Т-клеток. Они назвали эти антитела анти-АТК. Как следует из ряда экспериментов, анти-АТК распознают поверхностные детерминанты рецепторов ТКФР [87]. Положительная реакция на АТК обычно коррелирует с присутствием на клетках рецепторов ТКФР, выявляемых по связыванию ТКФР или по индуцированной ТКФР пролиферации клеток [54]. Клинически Т-клеточный лейкоз взрослых (ТЛВ) [9, 12, 14, 166] и синдром Сезари [10, 11, 89] являются лимфопролиферативными расстройствами, затрагивающими зрелые Т-клетки. Однако ТЛВ этиологически связан с HTLV (см. ниже). На основании полученных результатов стало ясно, что клетки ТЛВ несут рецепторы ТКФР, а клетки Сезари их не имеют [170]. Все известные в настоящий момент Т-клеточные новообразования, положительные на HTLV, содержат рецепторы ТКФР (являются АТК-положительными). Таким образом, в настоящее время связывание анти-АТК — один из наиболее целесообразных и важных тестов на присутствие HTLV (см. следующий раздел). Грин и др. нашли, что у HTLV-положительных неопластических Т-клеток число рецепторов ТКФР больше, чем у нормальных Т-клеток, активированных лектинами [54]. Возможно, рецепторы ТКФР неопластических HTLV-положительных Т-клеток чем-то отличаются от рецепторов нормальных Т-клеток.

## ИНФЕКЦИОННЫЕ АГЕНТЫ

Выделение вируса Т-клеточного  
лейкоза человека (подгруппы I и II)

Большинство работ нашей лаборатории в течение многих лет основывалось на предпосылке, что репликация вируса при лейкозах человека происходит на очень низком уровне и что вирус присутствует только в небольшой части клеточной популяции. Поэтому мы считали, что успех в выделении вируса в большой степени зависит от способности выращивать клетки крови различного происхождения и от чувствительности методов определения специфических вирусных маркеров, например небольшого количества связанной с частицами обратной транскриптазы. Если взглянуть ретроспективно, то следует признать, что успешное выделение HTLV было достигнуто благодаря более раннему открытию ТКФР, которое сделало возможным выращивание Т-лимфоцитов человека *in vitro*, а также благодаря разработке способа определения малых количеств обратной транскриптазы и возможности отличать ее от клеточных ДНК-полимераз.

Как указано выше, неопластические Т-клетки от некоторых больных способны расти в суспензионной культуре в присутствии ТКФР [109]. Процедура, использованная для их выделения, основана на специально разработанной методике культивирования Т-лимфоцитов человека в присутствии ТКФР [102]. Клетки свежей периферической крови больных, представляющих интерес, фракционировали в градиенте фикола — хипака, обрабатывали в течение 48—72 ч ФГА-Р и затем выращивали в полной среде с добавлением 20% сыворотки плода коровы и 10% ТКФР. Клеточные культуры наблюдали через регулярные интервалы, пытаясь обнаружить определенные морфологические изменения (см. ниже), а также выявить экспрессию вируса. Сначала экспрессию вируса определяли по освобождению обратнотранскриптазной вирусной активности в культуральную жидкость и с помощью электронного микроскопа. В дальнейшем были получены специфические реагенты для однозначного выявления и характеристики белков и нуклеиновых кислот HTLV-I. HTLV-I впервые обнаружен в культуре Т-клеток от двух больных негров-американцев с агрессивными формами Т-клеточного злокачественного заболевания, которые вначале считали агрессивным вариантом фунгоидного микоза и синдромом Сезари [108, 110]. Как стало ясно позже, на самом деле эти формы идентичны описанному в Японии ТЛВ [157, 158, 166] и Т-лимфосаркоматозному лейкозу у карибских негров-иммигрантов, живущих в Лондоне [14]. Морфология HTLV-I типична для ретровируса типа С, почкующегося от клеточной мембраны (рис. 32.1). Обычно размеры HTLV-I со-



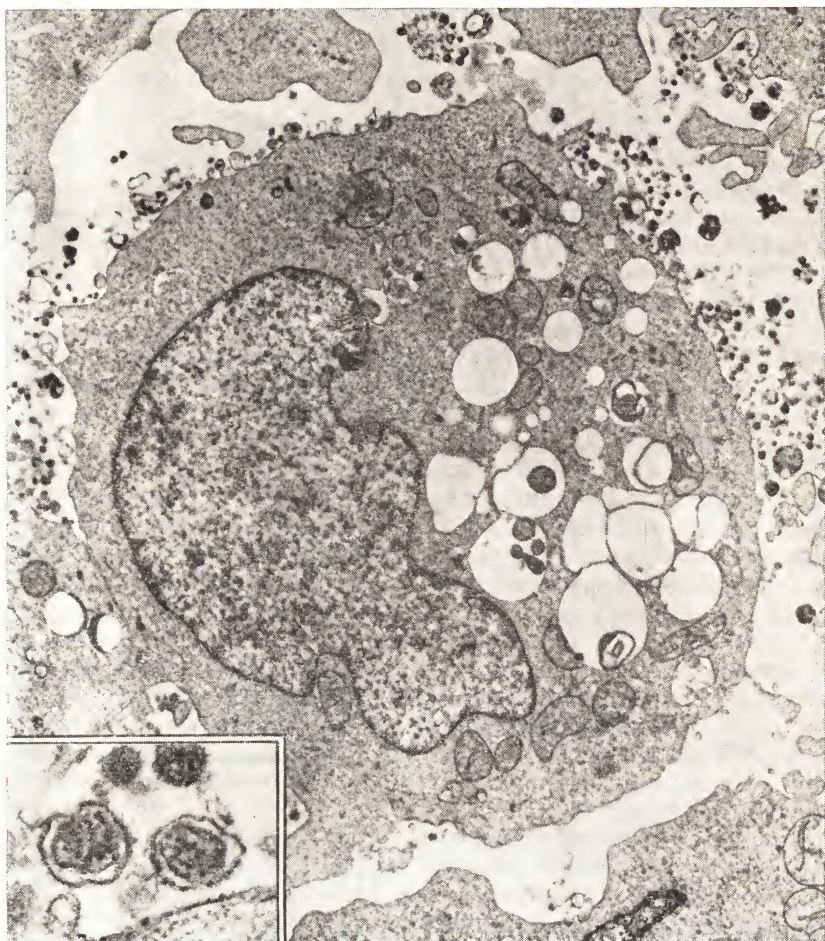


Рис. 32.1. Электронная микрофотография клеток, продуцирующих HTLV-I. Слева на врезке показаны зрелые вирионы.

ставляют  $\sim 1,000 \text{ \AA}$ , но во вновь полученных культурах они варьируют в пределах  $900\text{--}1400 \text{ \AA}$ . Судя по нуклеиновым кислотам и антигенным детерминантам, первые два изолята в США близкородственны. Их назвали HTLV типа I (HTLV-I) с нижними индексами — инициалами больных.

После первого выделения вирусов в США в нашей лаборатории получено много дополнительных изолятов от больных из США, стран Карибского бассейна, Японии, Африки, Южной Америки и Израиля [40, 41, 79, 110, 115, 135]. В Японии [100, 179],



США [63], Голландии [169] и Великобритании [14, 53] независимо были получены изоляты главным образом из Т-клеток больных ТЛВ и в нескольких случаях от здоровых членов их семей [135].

Моноклональные и гипериммунные антитела к структурным белкам первых изолятов HTLV-I [64, 65, 128] были чрезвычайно полезны для обнаружения клеток, зараженных HTLV, и очень облегчили последующие выделения HTLV. Часто после идентификации антигенов HTLV первичные клетки культивировали совместно с нормальными Т-клетками человека. После успешной передачи некоторые из зараженных клеток приобретают способность к неограниченному росту (см. ниже). Примеры первых изолятов HTLV, сведения о больных и их клинические диагнозы приведены в табл. 32.1. Кариотипы и HLA-характеристики всех клеточных линий соответствуют таковым первичных нормальных донорских клеток. Кроме того, специфичность HLA-характеристик каждой линии клеток подтверждает, что присутствие вируса не обусловлено перекрестным загрязнением. Проведено сравнение различных вирусных изолятов по иммунным перекрестным реакциям вирусных белков [79, 110, 113] (см. ниже), гомологии последовательностей (по данным молекулярной гибридизации) [110, 114, 121], участкам расщепления рестрикционными эндонуклеазами [176] и нуклеотидным последовательностям [61]. Различные подходы показали, что все изоляты близкородственны и принадлежат к одной и той же подгруппе HTLV-I. Сюда же относится независимо полученный изолят из Японии, который был ранее обозначен ATLVI [100, 179]. Все изоляты HTLV, даже принадлежащие к различным подгруппам (см. ниже), имеют общие черты, а именно: а) они выделены из зрелых Т-клеток; б) инфекционны главным образом для ОКТ4-положительных Т-клеток; в) их внутренние белки обладают перекрестной иммунной реактивностью; и г) их обратные транскриптазы сходны по размерам и биологическим свойствам.

Как отмечено выше, громадное большинство изолятов близкородственны между собой, что следует из серологических тестов и изучения нуклеиновых кислот. Правда, есть несколько исключений. Мы обнаружили и выделили [79] ретровирус из Т-клеточной линии [141], полученной от больного с Т-клеточным вариантом «волосково-клеточного» лейкоза. Эта клеточная линия, названная МО, обладает свойствами, очень сходными со свойствами клеток, из которых был выделен HTLV-I. Сыворотка от больного осаждала р24 из HTLV-I, однако при детальном изучении с применением гомологического конкурентного радиоиммуноанализа обнаружились значительные различия между выделенным вирусом и другими изолятами [46, 121]. При определении антител к антигенам оболочки HTLV-I в опытах нейтрализации биологи-

Таблица 32.1. Изоляты HTLV, полученные от больных с Т-клеточными злокачественными заболеваниями или СПИДом, а также от здоровых членов их семей

Обозначения <sup>1</sup>	Диагнозы <sup>2</sup>	Страна проживания больного
HTLV-I <sub>CR</sub>	КТКЛ, ФМ	США
HTLV-I <sub>МJ</sub>	КТКЛ, Сезари	»
HTLV-I <sub>МВ</sub>	То же	Страны Карибского бассейна
HTLV-I <sub>MI</sub>	КТКЛ	То же
HTLV-I <sub>SO</sub>	ТЛВ	Япония
HTLV-I <sub>SK</sub>	»	»
HTLV-I <sub>TK</sub>	ПЛ (мать SK)	»
HTLV-I <sub>НК</sub>	Здоровый (отец SK)	»
HTLV-I <sub>BK</sub>	Здоровый (брат SK)	»
HTLV-I <sub>PL</sub>	ДСЛ	США
HTLV-I <sub>WA</sub>	ТКЛ	»
HTLV-I <sub>ОВ</sub>	»	»
HTLV-I <sub>UK</sub>	ПТКЛ	Израиль
HTLV-I <sub>DEL</sub>	ТКЛ	Африка
HTLV-II <sub>МО</sub>	ТВВЛ	США
HTLV-I <sub>EP</sub>	СПИД	»
HTLV-I <sub>CH</sub>	»	Страны Карибского бассейна
HTLV-II - J P	»	США

<sup>1</sup> Нижние индексы означают инициалы больных.

<sup>2</sup> КТКЛ — кожная Т-клеточная лимфома; ФМ — фунгоидный микоз; ТЛВ — Т-клеточный лейкоз — лимфома взрослых; ДСЛ — диффузная смешанная лимфома; ТКЛ — Т-клеточная лимфома; ПТКЛ — периферическая Т-клеточная лимфома; ТВВЛ — Т-клеточный вариант «волосково-клеточного» лейкоза; СПИД — синдром приобретенного иммунодефицита; ПЛ — персистентный лимфоцитоз.

ческой активности эти различия выявились еще резче. В одном случае наблюдали нейтрализацию формирования синцития, индуцированного HTLV-I, а в других использовали псевдотипы вируса везикулярного стоматита в оболочках HTLV. Результаты всех проб свидетельствуют о том, что МО-изолят значительно отличается от HTLV-I по оболочечным антигенам (R. Weiss, личное сообщение). Изолят из клеточной линии МО был назван HTLV-II<sub>МО</sub>. Родственный HTLV-II<sub>МО</sub> вирус был получен от больного СПИДом (M. Porovic, неопубликованные данные). По Т-клеточной тропности и биохимическим свойствам (потребность в ионах и матрице) его обратной транскриптазы этот вирус сходен с HTLV-I. Провирусы обоих вирусов (HTLV-I и HTLV-II) в настоящее время молекулярно клонированы, а их нуклеиновые кислоты секвенированы. Определены также аминокислотные последовательности большинства их белков. После того как эта информация стала доступной, были идентифицированы и другие имеющие незначительные отличия в геномах варианты HTLV-I

[147]. Недавно выделенный от больных СПИДом или пре-СПИДом член группы HTLV—HTLV-III обсуждается ниже. По крайней мере от двух видов человекоподобных приматов Старого Света выделены ретровирусы, близкородственные HTLV-I [101]. Молекулярный анализ изолятов этих ретровирусов, проведенный в нашей лаборатории, показал, что они очень близки к HTLV-I, но отличаются от него [56].

### Нуклеиновые кислоты

Большая часть первоначальной работы с нуклеиновыми кислотами HTLV-I была проведена с использованием первого изолята HTLV-I<sub>CR</sub>. Как и у всех ретровирусов, в его геном входит высокомолекулярный РНК-комплекс, состоящий из полиаденилированных РНК-субъединиц. Для опытов по гибридизации нуклеиновых кислот использовали радиоактивную кДНК, полученную при обратной транскрипции вирусной РНК под действием эндогенной обратной транскриптазы. Эти опыты показали, что HTLV-I<sub>CR</sub> не связан с ранее известными ретровирусами животных [120]. Аналогичные опыты со вторым изолятом HTLV-I (HTLV-I<sub>MB</sub>), полученным от больного кожным Т-клеточным лейкозом, показали, что этот изолят идентичен или очень близок HTLV-I<sub>CR</sub>. В некультивированных клетках периферической крови этого больного обнаружены последовательности провирусной ДНК HTLV-I<sub>MB</sub> [110]. За исключением этих случаев, обширный ряд клеток и тканей человека не содержал последовательностей провируса HTLV-I [120], т. е., по-видимому, HTLV-I не является эндогенным ретровирусом человека. Более того, вирус не был передан больному CR генетическим путем, так как в В-клеточной линии, полученной от этого больного, провирусную ДНК обнаружить не удалось [40]. Следовательно, вирус был приобретен в результате экзогенного заражения. Наличие вируса в Т-клетках больного и его отсутствие в большинстве или во всех В-клетках было первым указанием на то, что HTLV является Т-тропным вирусом. Дополнительные биологические данные, рассматриваемые ниже, подтвердили это заключение.

Используя изолят HTLV (первоначально названный ATLВ), полученный от японского больного ТЛВ, Йошида с коллегами подтвердили неэндогенную природу HTLV и его горизонтальную передачу [179]. Методом блот-гибридизации по Саузерн они нашли провирусную ДНК HTLV-I в Т-клетках всех обследованных больных ТЛВ. По гомологии нуклеиновых кислот и по антигенному сходству белков *gag* [114] японский изолят HTLV близкородствен или идентичен исходному HTLV-I. Поэтому считают,



что этот изолят должен принадлежать к группе HTLV-I [170a].

Более детальное изучение стало возможным благодаря недавнему молекулярному клонированию HTLV-I и HTLV-II [46, 91, 145, 146]. В настоящее время опубликована полная нуклеотидная последовательность клонированной ДНК HTLV [146]. Провирусный геном HTLV, подобно геномам других ретровирусов, на обоих концах провирусной ДНК имеет длинные концевые повторы (LTR), отличающиеся рядом особенностей. Те участки их последовательности, которые происходят от уникальных 5'-концевых РНК-последовательностей (U5) и последовательностей, повторяющихся на обоих концах геномной ДНК (R), необычно велики (174 и 224 основания соответственно), т. е. длиннее, чем у большинства других ретровирусов, и в этом отношении они больше напоминают BLV. Другой необычной чертой LTR HTLV-I является то, что сигнал полиаденилирования РНК ААТААА расположен примерно за 250 оснований до его ожидаемого положения. Исходя из этого, Сейки и др. [146] предположили, что сигнал ААТААА сближается с соответствующим участком полиаденилирования при образовании вторичной структуры РНК-транскрипта.

Аминокислотные последовательности, определенные по открытым рамкам считывания в уникальной области провируса, позволяют считать, что HTLV имеет 4 гена. Гены *gag*, *pol* и *env* расположены в том же порядке, что и у других ретровирусов, способных к репликации. Особенностью генома HTLV является наличие большой открытой рамки считывания между геном *env* и последующим LTR, которая в различных фазах считывания способна кодировать четыре белка с мол. массами 10, 11, 12 и 27К (рис. 32.2). Сейки и др. [146] назвали эти белки, функция которых в настоящее время неизвестна, белками рХ. Последовательности рХ имеют вирусное происхождение, так как в незараженных клетках они не обнаружены. Не исключено, что уникальные структурные особенности HTLV имеют особое значение для способности этого необычного лейкозного вируса трансформировать зараженные клетки, что отличает его от других вирусов хронических лейкозов (см. ниже).

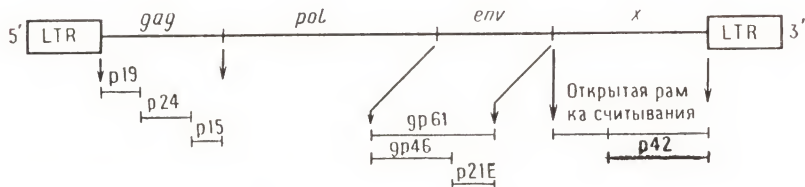


Рис. 32.2. Организация генов HTLV-I и HTLV-II.

## Белки

Продукты генов *gag*, *pol*

Гены *gag*, *pol* и *env* HTLV кодируют структурные белки, обратную транскриптазу и белок оболочки вируса соответственно. Продукт гена *gag* HTLV-I является полипротеином, состоящим из p19 на N-конце, p24 в середине и p15 на C-конце. Этот предшественник процессируется с образованием отдельных белков. Все три белка относятся к белкам сердцевины вируса. Они экстрагированы из вириона, получены в гомогенном состоянии [75, 78, 142] и почти полностью секвенированы [23, 106; неопублико-

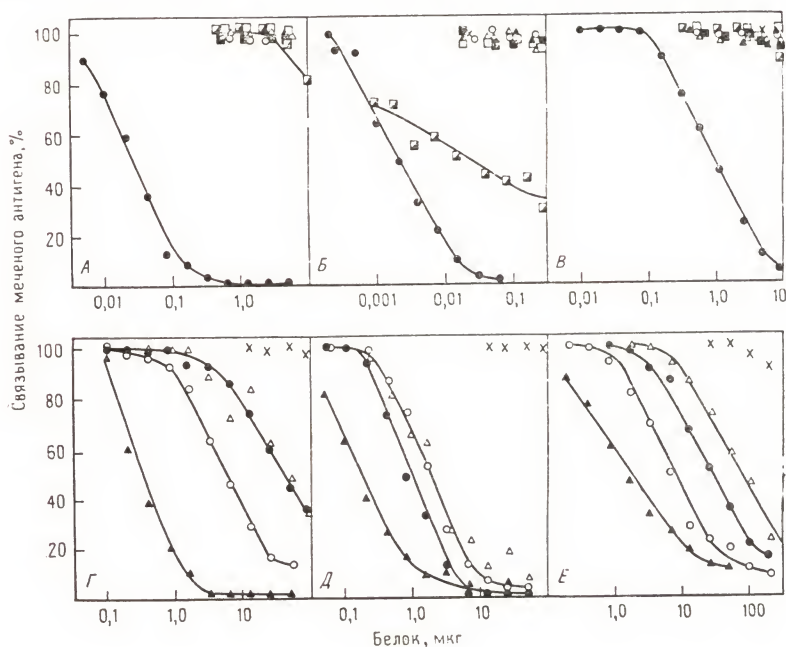


Рис. 32.3. Гомологичный конкурентный радиоиммуноанализ p19, p24 и p15 HTLV-I с использованием меченных  $^{125}\text{I}$  p19 (А, Г), p24 (Б, Д) или p15 (В, Е) HTLV-I и предельных разведений козьих антител к HTLV-I. В качестве конкурирующего немеченого антигена были использованы ретровирусы и клетки, солицилизированные в детергентно-солевом растворе. Обозначения для конкурирующих вирусов (А, Б, В): ● HTLV-I, ○ Ra-MLV, △ FeLV, ▲ SSV, □ BaEV, ▽ SMRV, ▼ MPMV, ■ BLV, ▨ HTLV-III и для конкурирующих клеток (Г, Д, Е): ● HUT 102, ○ MJ, △ CTCL-2, ▲ MT-2, × нормальные клетки. Все клетки, кроме нормальных, продуцируют HTLV-I. Нормальные Т-клетки человека были выращены в присутствии Т-клеточного фактора роста.

ванные данные]. Иммунологические свойства p19, p24 и p15 детально охарактеризованы [75, 78]. Эти белки несут совершенно различные антигенные детерминанты и специфически экспрессируются в клетках, продуцирующих HTLV-I. При проведении чувствительного конкурентного радиоиммуноанализа ни один из большого числа ретровирусов млекопитающих, за исключением, разумеется, группы HTLV, не препятствует осаждению меченых p19, p24 или p15 (рис. 32.3), что свидетельствует об уникальности этих белков HTLV-I. Среди белков *gag* p24 имеет наибольшую перекрестную реактивность между HTLV-I и HTLV-II. Структурный анализ очищенных белков *gag* выявил некоторые интересные особенности. Попытки определить N-последовательности посредством эдмановской деградации очищенного p19 оказались безуспешными, так как РТН-аминокислоты не образовывались. Впоследствии было установлено, что N-конец p19 блокирован миристиловым радикалом, присоединенным через амидную связь [105]. Поэтому аминокислотная последовательность p19 определена по пептидным фрагментам, полученным в результате ферментативного расщепления. При сравнении полученных последовательностей пептидов и аминокислотных последовательностей, построенных по нуклеотидным последовательностям геномной ДНК HTLV-I [146], наблюдалось отличное совпадение и удалось идентифицировать локализацию пептидов в молекуле p19 [105].

В ранних экспериментах было идентифицировано 25 аминокислот N-конца p24 HTLV-I, и таким образом впервые была показана структурная взаимосвязь этого белка с мажорными белками сердцевинных ретровирусов другого типа — типа С, особенно с p24 BLV [105]. Поскольку выраженной гибридизации нуклеиновой кислоты с генами других ретровирусов не наблюдается [120] и иммунологические перекресты между белками HTLV-I и белками других ретровирусов отсутствуют [75, 78], гомология первичной структуры оказалась первым прямым свидетельством того, что p24 HTLV кодируется ретровирусным геном, родственным генам *gag* известных ретровирусов млекопитающих. У HTLV-I и BLV наблюдается гомология не только по p24 (по всей длине его молекулы), но и по аминокислотным последовательностям вирусных белков, связывающихся с нуклеиновыми кислотами, p15 у HTLV-I и p12 у BLV [23]. Несмотря на то что существующая гомология недостаточна для того, чтобы обнаружить перекрестные реакции при стандартном радиоиммуноанализе [75, 78], ее хватило для того, чтобы обнаружить перекрестную реактивность при не столь высоко специфичном вестерн-блоттинге [105, 162]. На основании этих результатов можно заключить: не исключено, что HTLV-I и BLV имеют далекого общего предка.



HTLV-I, HTLV-II и HTLV-III (см. ниже) имеют обратную транскриптазу, отличающуюся по биологическим свойствам от обратных транскриптаз большинства ретровирусов млекопитающих типа С. У HTLV этот фермент больше, чем у других вирусов (100К), и предпочитает в качестве дивалентного катиона  $Mg^{2+}$ , а не  $Mn^{2+}$  [108]. В опытах с очищенной обратной транскриптазой HTLV-I было показано, что она не дает перекрестных иммунных реакций с обратными транскриптазами других ретровирусов [122]. Степень перекрестной реактивности между ферментами HTLV-I и HTLV-II не определена.

### Гликопротеин оболочки

Точные размеры продукта гена *env* HTLV-I — гликопротеина с мол. массой 61—68К — зависят от индивидуальной клеточной линии [84, 144]. Этот продукт первичной транскрипции обнаруживается только в клетке. В зрелом вирионе он присутствует в процессированном виде как молекула меньшего размера. В гликопротеине содержатся два функциональных домена: наружная гликопротеиновая часть (gp46) и трансмембранная часть (p21). Две части связаны друг с другом дисульфидными мостиками, так же как и у большинства других ретровирусов млекопитающих. Вначале при выделении гликопротеина и трансмембранного белка из HTLV-I столкнулись с большими трудностями, обусловленными хрупкостью оболочки вириона и потерей ее во время очистки вируса. Поэтому использовали альтернативный подход. Поскольку полная нуклеотидная последовательность генома HTLV-I известна [146], из нее можно вывести аминокислотную последовательность оболочечного белка. С помощью сыворотки больного ТЛВ, содержащей антитела к антигенам HTLV-I, из экстракта продуцирующих HTLV-I клеток HUT-102 был осажден гликопротеин с мол. массой 61К (gp61) [84]. В результате аминокислотного секвенирования (путем автоматической эдмановской деградации) полученного иммунопреципитацией меченного  $^{35}S$ -цистеином gp61 HTLV-I радиоактивные цистеиновые остатки были обнаружены в циклах 6, 7, 21 и 28 [84]. Это полностью соответствовало вычисленной последовательности оболочечного гликопротеина и указывало на то, что от продукта гена *env* отщеплена лидерная последовательность из 20 аминокислот. При аналогичном определении последовательности первых 22 остатков gp45, меченного  $^{35}S$ -цистеином, радиоактивный цистеин был обнаружен в циклах 6, 7 и 21. Отсюда следует, что gp45 образуется из N-концевой части gp61 в результате акта отщепления в области С-конца. Таким образом, антиген p61, который преципитируется сывороткой больных ТЛВ, действительно является оболочечным гликопротеином HTLV-I [84]. Аналогичное заключение было сде-

лано в результате изучения специфической иммунной реактивности, остающейся в сыворотке больного ТЛВ после тщательной абсорбции *gag*-антигенами HTLV-I [144]. Таким способом было выяснено, что р61 из клеток HUT-102 антигенно не родствен белкам р24 и р19 HTLV-I, однако он родствен гликопротеину, имеющему мол. массу 45К. Эти исследования подтвердили, что вирионный *gp45* произошел из *gp61* клеток, продуцирующих вирус [144].

Знание нуклеотидной последовательности вирусного генома сделало возможным еще один подход к изучению оболочечного гликопротеина HTLV-I. Синтезировали олигопептиды с последовательностями, соответствующими аминокислотным последовательностям, определенным по различным частям гена белка оболочки. С помощью этих синтетических пептидов на кроликах получили гипериммунные сыворотки, которые затем применили для идентификации реагирующих с ними белков вириона и вируспродуцирующих клеток.

После того как полностью секвенировали ген *env* HTLV-II [150], обнаружили, что прочитанная в соответствии с кодом аминокислотная последовательность предшественника белка оболочки HTLV-I чрезвычайно сходна с последовательностью аналогичного белка HTLV-II. Оба они имеют состоящую из 20 аминокислот гидрофобную лидерную последовательность. Трансмембранный белок HTLV-I содержит 176 аминокислот. Два белка-предшественника имеют одинаковые аминокислоты в 336 из 448 позиций, а 68 замен из 152 являются консервативными [150]. Помимо существенной гомологии аминокислотных последовательностей в оболочечных белках обоих вирусов сходным образом размещены потенциальные участки гликозилирования [150]. Неудивительно поэтому, что белки оболочки этих двух вирусов дают перекрестные реакции [85].

### Белок рХ

Одной из особенностей HTLV-I и HTLV-II по сравнению с другими, не вызывающими острых инфекций ретровирусами, которые содержат гены *gag*, *pol* и *env*, является то, что они имеют добавочную последовательность приблизительно из 1600 нуклеотидов, расположенных между 3'-концом гена *env* и 5'-концом участка U3 провирусного длинного концевой повтора (LTR) [146]. Нуклеотидная последовательность этого участка провирусного генома HTLV-II опубликована [61]. При сравнении этой последовательности с соответствующим участком HTLV-I видно, что 5'-концевые области обладают небольшой степенью консервативности, а 3'-концевые области размером ~1000 нуклеотидов чрезвычайно сходны. В последних совпадают 765 из 1011 остат-

ков. В 3'-области нуклеотидной последовательности генома HTLV-II содержится одна открытая рамка считывания, способная кодировать полипептид из 337 аминокислотных остатков [61]. В аналогичной последовательности HTLV-I выявляется открытая рамка считывания, способная кодировать полипептид длиной 357 аминокислот. Белки, потенциально кодируемые этими длинными открытыми рамками считывания (LOR) HTLV-I и HTLV-II, имеют приблизительно одинаковую длину и одни и те же аминокислотные остатки в 259 позициях из 337. Недавно обнаружен белок с мол. массой 42К, который должен соответствовать белку LOR HTLV-I [86]. Высказываются предположения, что белок LOR играет специальную регуляторную роль в биологических системах HTLV-I и HTLV-II (см. ниже).

### КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Новое заболевание, названное Т-клеточным лейкозом/лимфомой взрослых (ТЛВ), впервые описано Такацуки с соавторами в конце 70-х годов. Проведя основанное на новой информации и использовании новых реагентов тщательное субтипирование лимфом и лейкозов и отнеся их к группе Т-клеточных или В-клеточных злокачественных заболеваний, авторы прежде всего обнаружили, что распространенность Т-клеточных злокачественных заболеваний в Японии относительно высокая [157, 158, 166]. Далее они заметили, что эти Т-клеточные злокачественные заболевания часто встречаются в юго-западных районах Японии, особенно в префектурах Кюсю и Сикоку [155].

В первых исследованиях больных с этой формой Т-клеточных злокачественных заболеваний было обнаружено, что болезнь обычно протекает бурно и включает системные проявления. Ее частыми дополнительными признаками служат кожные проявления и гиперкальциемия. Результаты гистопатологических исследований позволяют думать, что это заболевание связано с размножением зрелых Т-лимфоцитов, часто содержащих ненормальные изогнутые ядра, похожие на те, которые наблюдаются при лейкозе Сезари — сходной болезни, не имеющей, однако, явного преобладания в каком-либо географическом регионе [58, 159]. Ядра при ТЛВ обычно имеют менее изогнутую форму и более «комковатый» вид, чем в клетках Сезари. Многоядерные гигантские клетки составляют небольшой процент общей популяции опухолевых клеток у больных ТЛВ. Однако во многих случаях морфологические признаки неопределенны; например, иногда изогнутость ядер не выявляется. В сущности патология этих зрелых Т-клеток может в значительной степени варьировать. Например, некоторые Т-клетки могут соответствовать диагнозу «диффузная гистиоцитарная лимфома», или «смешанная», или «круп-



ноклеточная лимфома Т-типа». Однако некоторые особенности, по-видимому, постоянны. Как обсуждалось выше, неопластические Т-клетки больных ТЛВ конститутивно экспрессируют рецепторы ТКФР. Они также обычно, но не всегда положительны на антиген хелпер/супрессорных Т-клеток, известный как ОКТ-4 или *leu3* [9, 40, 63, 114, 115, 177]. Однако функциональные исследования, проведенные в Японии [62, 159] и США [165, 170] с ОКТ-4-положительными клетками ТЛВ, показывают, что либо у этих клеток не удается определить какую-либо функцию, либо они имеют супрессорную функцию. Гиперкальциемия, часто наблюдаемая у больных ТЛВ, очевидно, связана с литическими поражениями костей [9], предположительно обусловленными действием фактора активации остеокластов.

Распространение агрессивного Т-клеточного (группы ОКТ-4) злокачественного заболевания взрослых описано также среди карибских негров-иммигрантов, живущих в Лондоне [5, 7, 14]. Тщательное клиническое и лабораторное исследование четко показало, что это заболевание аналогично или идентично заболеванию, распространенному в юго-западной Японии. Таким образом, Карибский бассейн определен как еще один эндемичный район ТЛВ. Одновременно случаи агрессивных форм Т-клеточных злокачественных заболеваний взрослых обнаружены в США. Обычно их относили к агрессивным вариантам фунгоидных микозов (или кожной Т-клеточной лимфомы) или к агрессивным вариантам Т-клеточного лейкоза Сезари. Среди больных здесь много негров из юго-восточной части США и стран Карибского бассейна [8, 14, 108, 110]. В настоящее время ясно, что болезнь, поражающая всех этих больных, имеет одно и то же происхождение.

Средний возраст начала заболевания для ТЛВ меньше, чем для большинства Т-клеточных злокачественных заболеваний взрослых. В Японии он составляет около 40 лет, а в европейских странах и странах Карибского бассейна немного меньше [8]. Замечено, что для людей, родившихся в эндемичных областях и переехавших в раннем возрасте в неэндемичные регионы, высокий риск развития ТЛВ сохраняется [80].

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

### Серозэпидемиология HTLV-I

Сыворотки больных с различными злокачественными заболеваниями параллельно с рядом контрольных сывороток были подвергнуты скринингу на наличие антител к белкам HTLV-I. Методы, используемые в этих исследованиях, включали а) твердофазный иммунологический анализ с использованием разрушенных вирусных частиц; б) радиоиммунопреципитационный анализ с ис-

пользованием чистых белков HTLV-I p24, p19 и p15 и в) непрямую иммунофлуоресценцию живых или фиксированных клеток, зараженных вирусом [77, 117, 127, 142]. В некоторых системах, например в системах а) и в), положительные результаты проверяли в дальнейшем на специфичность с использованием соответствующих контролей. Результаты этих исследований (табл. 32.2)

**Таблица 32.2. Распространение антител к HTLV в сыворотках больных со злокачественными заболеваниями зрелых Т-клеток, их здоровых родственников и случайных нормальных доноров**

Субъекты	Антитела к HTLV	
	число положительных/число проверенных	доля положительных, %
Здоровые родственники больных из США, зараженных HTLV	5/35	14
Случайные здоровые доноры (Вашингтон)	1/185	<1
Случайные здоровые доноры (Джорджия)	4/538	<1
Карибские больные ТЛВ	11/11	100
Здоровые родственники карибских больных	4/20	20
Случайные здоровые доноры (страны Карибского бассейна)	12/337	4
Японские больные ТЛВ	45/52	87
Здоровые родственники больных ТЛВ	20/43	47
Случайные здоровые доноры неэндемичного района Японии	9/600	2
Случайные здоровые доноры эндемичного района Японии	50/419	12

можно суммировать следующим образом: сыворотки больных ТЛВ почти всегда положительны на HTLV-I. Здоровые, а также больные с лейкозами и лимфомами не Т-клеточного происхождения не имеют антител к HTLV-I, так же как больные с Т-лейкозом не HTLV-I-типа. В географических районах, эндемичных для ТЛВ, распространение бессимптомных носителей, имеющих антитела, значительно выше, чем в неэндемичных районах. Например, в Японии число здоровых, имеющих антитела, колеблется от 0% в префектуре Хоккайдо на севере до 16% в районе Нагасаки и 15% в районе Кагосима в префектуре Кюсю на юго-западе [125]. Распространение антител заметно коррелирует с географическим распределением ТЛВ [68, 69, 77, 125, 127, 129]. Ко второй хорошо документированной эндемичной области распространения связанных с HTLV-I злокачественных заболеваний относится Карибский бассейн. В одном исследовании было показано, что в 70% всех злокачественных, не связанных с болезнью Ходжкина лимфоидных заболеваний, наблюдаемых на Ямайке в последние годы, в сыворотке содержались антитела к HTLV-I [6]. Почти

100% больных ТЛВ карибских негров-иммигрантов, живущих в Англии, имели антитела к HTLV-I [5, 7, 14]. 2—10% здоровых жителей Ямайки имеют антитела к HTLV-I, причем предварительные результаты показывают, что на о. Гаити распространение носителей еще выше.

Злокачественные Т-клеточные заболевания взрослых, имеющих антитела и клинические симптомы, сходные с типичными проявлениями ТЛВ, периодически обнаруживают в США и Израиле [41]; в менее обширных обследованиях подобные случаи идентифицированы в Центральной и Южной Америке, а также в Африке. Так как в последнем случае отдельные регионы были эндемичными, мы полагаем, что в дополнительных исследованиях будут идентифицированы группы больных ТЛВ. Антитела обнаружены у 2—10% здорового населения Кейптауна (Южная Африка), Нигерии, Египта, Туниса и Ганы [140].

В отличие от ТЛВ, когда существует четкая этиологическая связь между HTLV-I и заболеванием, отдельные случаи обнаружения антител у больных с лейкозами и лимфомами, не связанные с Т-клетками, или у больных детскими лейкозами, возможно, обусловлены заражением HTLV, который мог попасть к ним в качестве «вируса-пассажира» при переливании крови. Кроме того, в некоторых эндемичных по HTLV-I районах обнаружили антитела при ТЛВ и при В-клеточных хронических лимфоцитарных лейкозах и в отсутствие переливания крови в анамнезе, причем процент таких случаев выше процента, наблюдаемого среди нормального населения. Возможно, что заражение нормальных Т-клеток HTLV ведет к нарушению их функционирования (см. ниже), что в свою очередь увеличивает риск развития лейкозов или лимфом, вызываемых другими причинами.

Сероэпидемиологические исследования указывают, что передача HTLV-I может происходить при близких или половых контактах, хотя, за несколькими исключениями, способ передачи еще не выяснен. К этому выводу приводят следующие размышления: кроме больных ТЛВ единственной группой с высоким процентом лиц, имеющих антитела, являются члены семей больных ТЛВ. В неэндемичных по ТЛВ районах они образуют единственную значительную группу носителей антител [126]. Имеющиеся данные позволяют думать, что внутрисемейная передача происходит от мужчины к женщине и от матери к ребенку [156]. В многочисленных обследованиях работников лабораторий, контактирующих с HTLV-I, было показано, что их сыворотки отрицательны по антителам к HTLV-I. Известно одно исключение — это работающая в лаборатории карибская женщина, в сыворотке которой антитела к HTLV-I появились по крайней мере за 8 лет до того, как в этой лаборатории был выделен вирус. Антитела к HTLV-I обнаружены также у людей, получивших при пе-



реливании кровь, положительную по HTLV [39]; антитела найдены у большого количества больных гемофилией [34], а также наркоманов, вводящих наркотики внутривенно, от которых был выделен вирус (Popovic, Gallo, неопубликованные данные). Вероятно, одним из основных источников распространения HTLV-I являются зараженные клетки. Передача может осуществляться лимфоцитами спермы при половых контактах, насекомыми-переносчиками при укусе, при переливании крови, при внутривенном введении наркотиков, путем обмена между матерью и плодом *in vivo* и, возможно, через материнское молоко.

### Молекулярная эпидемиология HTLV-I

Возможность молекулярного клонирования ДНК-зондов, специфических для LTR и других участков генома HTLV-I, позволяет использовать их для скрининга провирусных последовательностей в ДНК культивируемых клеток, а также в некультивированных свежих опухолях от больных ТЛВ и другими злокачественными заболеваниями [176, 179]. Эти исследования с использованием блот-гибридизации по Саузерну [152], первоначально проведенные двумя группами [176, 179], привели к одинаковым выводам: а) свежие клетки от всех больных с типичным ТЛВ содержат одну или несколько копий провируса HTLV; б) в большинстве случаев провирус был полным, однако в нескольких случаях провирусная ДНК состояла только из LTR и последовательностей гена *env*; в) неопластические клетки, полученные при злокачественных заболеваниях других типов, включая незрелые Т-клетки, В-клетки или миелоидные клетки, обычно не содержали последовательностей HTLV-I; г) результаты молекулярной гибридизации и исследований сывороточных антител очень тесно коррелировали; однако в нескольких случаях в неопластических Т-клетках от больных, не содержащих сывороточных антител, были обнаружены последовательности HTLV-I; д) место интеграции HTLV-I специфично для каждого больного, т. е. нет двух больных, имеющих одинаковые клеточные последовательности, фланкирующие интегрированные провирусы; е) эксперименты по молекулярной блот-гибридизации по Саузерну, как уже обсуждалось выше, показывают, что интеграция носит олигоклональный или моноклональный характер. Другими словами, после обработки рестрикционной эндонуклеазой, не расщепляющей провирус, почти во всех HTLV-I-положительных опухолях обнаружены большие, чем провирус, ДНК-фрагменты определенного размера. Это позволяет предположить, что в большей части (если не во всей популяции) клеток опухоли к последовательностям провируса прилегают одни и те же клеточные последовательности, т. е. в каждом случае неопластической трансформации предшествует

инфекция HTLV-I; ж) ДНК из всех связанных с HTLV-I злокачественных образований, за исключением одного, содержала сохраненные последовательности провируса HTLV-I. Это наглядно показывает, что независимо от источника опухоли, которая может быть получена от больного из Японии, Южной Америки, стран Карибского бассейна, США и т. д., вирус в ней один и тот же. Единственным исключением является больной, зараженный вирусом HTLV-II, из клеток которого был впервые изолирован этот вирус; з) картина интеграции в клеточных линиях, полученных из HTLV-положительных опухолей, в некотором отношении отличается от картины, наблюдаемой в первичных опухолях: в первом случае обычно больше копий провируса и больше дефектных провирусов, а локализация провирусной ДНК в хромосомах варьирует.

## ПАТОГЕНЕЗ

### Трансформация свежих Т-лимфоцитов человека HTLV-I

Предположение о способности HTLV заражать свежие лейкоциты человека *in vitro* высказано Миоши и др. [100]. При попытке вырастить *in vitro* лейкозные клетки от ТЛВ-доноров они обнаружили, что использованные в качестве питающих клеток лейкоциты плацентарной крови заражены HTLV-I. В последующих опытах [92, 93, 113, 133, 178] они показали, что способностью заражать и трансформировать Т-лимфоциты человека *in vitro* обладают HTLV-I из большого числа клеточных источников. Используемые ими процедуры были аналогичны тем, которые применялись для инициации культивирования свежих лейкозных Т-клеток в клеточной культуре. Лейкоциты из нормальных источников, например из плацентарной крови или костного мозга, фракционировали в градиенте фикола-хипака, инкубировали 48—72 ч с ФГА-Р и выращивали в среде с добавлением ТКФР. HTLV-I переносили в эти клетки путем совместного культивирования с HTLV-I-положительными лейкозными клетками (полученными из клеточных линий, растущих *in vitro*), облученными или обработанными митомином С для угнетения репликации клеток-доноров.

Зараженные реплицирующиеся клетки появлялись в течение 3—6 нед после контакта с HTLV-I и в конечном счете заселяли культуры. Клетки не нуждались в добавлении ТКФР, правда, в его присутствии иногда облегчались начальные ступени трансформации. Время удвоения трансформированных HTLV-I клеток составляло 40—60 ч, а уровень клеточного насыщения —  $2 \cdot 10^6$  клетка/мл. Свежие лейкоциты периферической крови взрос-

лых заразить HTLV-I довольно трудно. При многократных попытках передать HTLV-I этим клеткам успеха достигали в редких случаях.

### Характерные особенности клеток, трансформированных HTLV-I

Т-лимфоциты, зараженные HTLV-I, имеют ряд свойств, общих с лейкозными Т-лимфоцитами от HTLV-позитивных больных. Некоторые из этих свойств приведены в табл. 32.3. Обычно многие Т-лимфоциты в зараженной культуре, подобно лейкозным Т-клеткам, многоядерны или имеют дольчатые ядра. Трансформированные HTLV-I клетки экспрессируют маркеры Т-лимфоцитов, включая рецепторы для эритроцитов барана (ОКТ 11/leu 5+) и способность реагировать с моноклональными антителами, специфическими для Т-лимфоцитов (leu 1+ и часто ОКТ3+). Гистохимически клетки окрашиваются положительно на неспецифическую эстеразу и кислую фосфатазу с образованием атипичной глобулярно-гранулярной картины. Однако эти клетки не имеют маркеров гранулоцитов, таких, как миелопероксидаза, хлорацетатэстераза и окрашивание суданом черным. Они также не содержат маркеров В-лимфоцитов, например поверхностного иммуноглобулина, нуклеиновой кислоты или антигенов вируса Эпштейна — Барр (EBV). Подобно лейкозным Т-лимфоцитам, трансформированные HTLV-I Т-лимфоциты плацентарной крови обычно относятся к ОКТ4/leu 3a+ (фенотип Т-хелперов). Трансформированные Т-лимфоциты костного мозга могут также экспрессировать поверхностные маркеры других Т-клеток [93], которые относятся к одной из трех категорий: а) ОКТ4/leu 3a+ (фенотип хелпер/индуктор); б) ОКТ8/leu 2a+ (фенотип киллер/супрессор или в) клетки, не обладающие никакими маркерами. По-видимому, у клеток, трансформированных *in vitro* HTLV-I, нет постоянной корреляции между клеточным фенотипом и функциональным подклассом Т-клеток. Обычно они не проявляют каких-либо функциональных свойств или цитотоксической активности.

Т-лимфоциты, трансформированные HTLV-I, отличаются от контрольных Т-лимфоцитов, стимулированных митогеном и выращенных в присутствии ТКФР, даже если они получены от того же донора, что и клетки, использованные для заражения. Например, даже в случае, когда и те и другие клетки экспрессируют рецепторы для ТКФР (определяемые с помощью анти-АТК или прямо по связыванию ТКФР) и маркеры HLA-DR, плотность этих маркеров в клетках, зараженных HTLV, приблизительно в 50 раз больше, чем в стимулированных митогеном Т-клетках человека, взятых из нормальной плацентарной крови [54]. Для



Таблица 32.3. Характеристика лейкозных Т-клеток больных ТЛВ и Т-клеток, трансформированных HTLV-I in vitro

Свойства	Источник клеток		
	Т-лимфоциты лейкозных доноров	трансформированные HTLV лейкоциты плацентарной крови	лейкоциты костного мозга
Морфология	Лимфоцитоподобные клетки с не- которым количеством доль- чатых ядер и многоядер- ные	Та же, что и у Т-лимфоцитов лейкозных доноров	Та же, что и у Т-лимфоцитов лейкозных доноров
Фенотип клеток	Преимущественно Т-клетки OKT4+	Тот же, что и у Т-лимфоцитов лейкозных доноров	OKT4+ или OKT8+ или ни тот ни другой
Потребности для роста in vitro	Часто ТКФР-	Обычно ТКФР-независимы	Обычно ТКФР-независимы
ТКФР-рецепторы	Присутствуют	Присутствуют	Присутствуют
Рецепторы трансферрина	»	»	»
Цитохимические маркеры	Неспецифическая эстераза и кислая фосфатаза; другие миелоидные маркеры отри- цательны	Те же, что и у Т-лимфоцитов лейкозных доноров	Те же, что и у Т-лимфоцитов лейкозных доноров
Конститутивная продукция лимфокинов	Да, включая ТКФР	Да	Да
В-клеточные маркеры	Нет	Нет	Нет
Продукция HTLV	Да	Да	Да, но некоторые нет
Новые HLA-маркеры клас- са I	»	»	Да

Т-лимфоцитов, трансформированных HTLV, характерен также повышенный уровень экспрессии рецепторов для трансферрина, как это и ожидается для быстро делящихся клеток. К другим обнаруживаемым в зараженных HTLV-I Т-клетках поверхностным маркерам, которых нет в В-клетках, трансформированных EBV, или в лимфоцитах свежей периферической крови от того же больного, относятся антигены локусов HLA-A и HLA-B [90]. Значение этих данных еще неясно, и вопрос о том, являются ли эти антигены индуцированными продуктами клеточных генов или относятся к новым вирусным антигенам, нуждается в дальнейшем изучении. Эти наблюдения важны для выяснения механизмов трансформации и чувствительности клеток к инфекции. Кларк и др. [19], используя молекулярные клоны HTLV-I и клоны генов, кодирующих антигены главного комплекса гистосовместимости человека, отметили слабую гомологию между областью гена *env* HTLV-I и кДНК-клоном HLA-B7.

#### **Клеточный и иммунологический регуляторный потенциал Т-лимфоцитов, трансформированных HTLV-I**

Хорошо известно, что Т-лимфоциты играют центральную роль в регуляции клеточного и гуморального иммунитета. Ряд функций Т-лимфоцитов осуществляется выделяемыми ими растворимыми биологически активными факторами, называемыми лимфокинами. Обнаружено, что культуры Т-лимфоцитов, полученные из периферической крови HTLV-I-позитивных больных с Т-клеточными злокачественными заболеваниями, из плацентарной крови человека или из трансформированных *in vitro* HTLV-I Т-клеток костного мозга, постоянно продуцируют один или несколько следующих факторов: фактор, увеличивающий миграцию макрофагов; фактор, подавляющий миграцию лейкоцитов; фактор, увеличивающий миграцию лейкоцитов; фактор, активирующий макрофаги; фактор, индуцирующий дифференцировку; фактор, стимулирующий рост колоний; фактор, стимулирующий рост и созревание эозинофилов; фактор, активирующий фибробласты;  $\gamma$ -интерферон [133]. Предварительные исследования позволяют думать, что кроме перечисленных видов активности в некоторых случаях могут также продуцироваться биологические активности, сходные с ТКФР, фактором роста В-клеток и тромбоцитарным фактором роста. Показано, что клеточные культуры некоторых Т-лимфоцитов, полученных от лейкозных доноров, также образуют небольшое количество ТКФР [50, 82]. Факторы, обнаруженные в нескольких клеточных линиях Т-лимфоцитов человека, зараженных HTLV-I, перечислены в табл. 32.4. Ряд наблюдений позволяет думать, что заражение HTLV-I приводит к изменению некоторых иммунных функций Т-лимфоцитов. Этот вопрос будет обсуждаться ниже.

Таблица 32.4. Факторы, вырабатываемые лимфоцитами человека, трансформированными HTLV-I

Фактор	Сокращение
Фактор, активирующий макрофаги	ФАМ (англ. MAF)
Фактор, подавляющий миграцию макрофагов	ФПММ (англ. MIF)
Фактор, подавляющий миграцию лейкоцитов	ФПМЛ (англ. LIF, NIF-T)
Активность, вызывающая выделение гистамина	АВГ (англ. HRA)
Фактор, увеличивающий миграцию лейкоцитов	ФУМЛ (англ. MEF)
Факторы хемотаксиса	
Интерферон $\gamma$	$\gamma$ -ИФН (англ. $\gamma$ IF)
Активность, индуцирующая дифференцировку	АИД (англ. DIA)
Активность роста и созревания эозинофилов	
Фактор, стимулирующий рост колоний	ФСК (англ. CSF)
В-клеточный фактор роста	ВКФР (англ. BCGF)
Т-клеточный фактор роста	ТКФР (англ. TCGF)

### Молекулярный механизм трансформации клеток HTLV-I

#### Последствия ретровирусной инфекции для хозяина

Ретровирусы можно подразделить на две группы: передающиеся потомству как эндогенные генетические элементы (их называют эндогенными ретровирусами) и приобретаемые организмом в результате экзогенного заражения. Эндогенные вирусы присутствуют в виде провирусной ДНК у многих животных, и их экспрессия не связана с какой-либо естественной неоплазией; не связана она также с какой-либо известной биологической функцией. Экзогенные вирусы в свою очередь можно подразделить на несущие ген *onc* и его не имеющие. Ген *onc* образуется из последовательностей клеточной ДНК в результате ее рекомбинации с ДНК инфицирующего вируса [154; см. также гл. 13]. Ретровирусы, содержащие ген *onc*, обычно дефектны, так как, приобретая его, они теряют часть генетической информации, необходимой для репликации вируса. Заражение ретровирусом, содержащим ген *onc*, совместно с недефектным вирусом-помощником, ведет к быстрому развитию злокачественного заболевания, обычно саркомы или острого лейкоза. Ген *onc* кодирует белок, который непосредственно вызывает трансформацию клетки, так что образование опухоли обычно поликлонально. Ретровирусы такого рода, способные быстро трансформировать клетки *in vitro*, относительно редко встречаются в природе и едва ли являются причиной естественно встречающихся злокачественных заболеваний. В силу их дефектности и быстрого развития злокачественного заболе-



вания они, как правило, исчезают со смертью животного-хозяина.

В противоположность содержащим ген *onc* ретровирусам, вызывающим острую трансформацию, экзогенные ретровирусы другой группы, не содержащие гена *onc*, обычно не трансформируют клетки *in vitro* и вызывают заболевание по истечении довольно значительного отрезка времени. Такие вирусы репликационно-компетентны и называются вирусами хронических лейкозов. Они часто являются причиной естественно встречающихся лейкозов и лимфом у нескольких видов животных, в том числе кур, мышей, кошек, крупного рогатого скота и обезьян (гиббонов) [39, 59, 72, 73, 175]. Однако механизм, с помощью которого эти вирусы вызывают лейкозы и лимфомы, еще неясен. При изучении птичьих лейкозов получены данные о том, что критическим фактором может быть сайт интеграции. На основании этих исследований выдвинуто предположение, что интеграция провируса возле гена *onc*, известного как *c-myc*, может приводить к активации экспрессии этого гена. Не исключено, что подобная активация является важным шагом в процессе лейкозогенеза. В настоящее время трудно сказать, какой механизм действует при других лейкозах, вызываемых другими хроническими лейкозными вирусами, тот же или сходный с ним. Необходимо также иметь в виду, что вирус может вызывать антиген-специфическую стимуляцию и пролиферацию иммунных клеток. В результате этих событий расширяется популяция клеток-мишеней, и поэтому возрастает риск вторичного онкогенного события, например соматической клеточной мутации [70, 173]. Согласно ряду данных, у некоторых ретровирусов трансмембранный пептидный компонент гликопротеина оболочки может быть прямым иммуносупрессором [17, 67], угнетающим миграцию макрофагов и лимфопролиферативную реакцию.

### Как HTLV-I трансформирует клетки?

#### Индукцирует ли HTLV-I ген *onc*?

Нормальные человеческие Т-клетки, зараженные HTLV-I, а также свежие лейкозные клетки представляют собой отличные системы для изучения механизма трансформации клеток HTLV. В зараженных клетках исследовали экспрессию различных известных генов *c-onc* и факторов роста. Все клетки, зараженные HTLV-I, имеют высокий уровень экспрессии рецепторов ТКФР [170]. Однако большинство этих клеток не образует ТКФР [133] и не экспрессирует мРНК ТКФР [3]. Поэтому обычная модель, основанная на аутоstimуляции зараженных клеток, не годится. Опубликованы данные о том, что рецепторы ТКФР клеток, зараженных HTLV-I, качественно отличаются от рецепторов нор-

мальных лимфоцитов, стимулированных митогенами [54]. В настоящий момент неизвестно, обеспечивают ли эти изменения поддержание клеток в активированном состоянии в отсутствие ТКФР.

В клетках, зараженных HTLV-I, нет постоянной активации экспрессии *onc*-генов *sis*, *myc*, *myb*, *fes*, *abl*, *src*, *H-ras* и *Ki-ras*. Ни в одном из опытов не было отмечено перестройки этих генов. Несколько первичных клеточных линий, полученных от больных ТЛВ, экспрессируют *c-sis*, что достаточно необычно для гемопоэтических клеток [174]. Показано, что клон кДНК из одной из этих линий трансформирует *in vitro* клетки NIH-3T3 [20]. Известно, что *c-sis* кодирует тромбоцитарный фактор роста (ТФР), который в норме действует на фибробласты, глиальные клетки и гладкие мышечные клетки [26, 171], в связи с чем представляет интерес изучение вопроса о функциональных особенностях продукта *c-sis* из клеток, зараженных HTLV-I, и о возможной стимуляции им пролиферации аутологичных клеток. Однако, поскольку экспрессия *c-sis* проявляется не во всех зараженных клетках, ясно, что для поддержания трансформации она не обязательна.

Как уже упоминалось выше, участки интеграции в некультивируемых клетках ТЛВ сохраняются у одного и того же больного, но варьируют от одного больного к другому. Это противоречит мнению о том, что механизм трансформации основывается на активации специфического клеточного гена, обусловленной встраиванием поблизости от него провируса.

#### Содержит ли HTLV-I ген *onc*?

В настоящий момент нет данных, указывающих на наличие в геноме HTLV-I каких-либо последовательностей клеточного происхождения [91, 120, 145, 146, 176, 179]. Ничего не известно пока и о наличии клеточных последовательностей между двумя LTR в интегрированной провирусной ДНК, чего можно ожидать в случае трансформирующего вируса. В отличие от ретровирусов, содержащих *onc*-гены, HTLV-I не имеет дефектов репликации. Кроме того, моноклональность участков интеграции в лейкозных клетках, а также в Т-клетках, трансформированных *in vitro*, не совпадает с обычной картиной, получаемой при инфекциях, которые обусловлены вирусами, вызывающими острую трансформацию. Тем не менее трансформация, вызываемая HTLV-I, относительно быстрая и не отражает известных свойств генов *gag*, *pol* и *env*. Единственной особенностью структуры HTLV-I является то, что в отличие от репликационно-компетентных лейкозных вирусов провирус HTLV-I содержит отрезок длиной ~1600 оснований между 3'-концом гена *env* и 5'-концом 3'-LTR [146]. Хотя этот участок, по-видимому, является избыточным геном, не требующимся для репликации вируса, он имеется у всех изолятов

HTLV-I и сходен с аналогичным отрезком в HTLV-II [61]. Это наводит на мысль, что данный генетический элемент играет важную роль; предложено несколько гипотез, согласно которым его продукт обуславливает уникальную трансформирующую способность этого лейкозного вируса. Сейки и др. [146] идентифицировали в этом генетическом элементе четыре открытые рамки считывания, которые могут кодировать белки размером 10, 11, 12 и 27К. Ни один из этих белков пока не идентифицирован, и об их функциях еще ничего не известно.

Хазелтайн и др. [61] определили нуклеотидную последовательность участка между геном *env* и 3'-LTR HTLV-II и сравнили ее с соответствующей последовательностью HTLV-I. Кроме того, что они обнаружили высокую гомологию между этими участками на протяжении 1000 нуклеотидов, они также идентифицировали одну длинную открытую рамку считывания (LOR), способную кодировать полипептиды длиной 357 аминокислот для HTLV-I и длиной 337 аминокислот для HTLV-II. В клеточной линии C81-66 (C63/CR), полученной из Т-клеток плацентарной крови человека после заражения HTLV-I, был идентифицирован белок с мол. массой  $\sim 42$ К (p42) [86]. Данная клеточная линия не продуцировала HTLV-I и экспрессировала только ограниченное число белков HTLV-I [134]. Белок p42 не связан с белками *gag* и *env* HTLV-I [85, 151]; выдвинуто предположение, что он является транс-действующим фактором, который имеет отношение к трансформирующей способности HTLV-I и HTLV-II [151]. Последовательности в геноме хозяйской клетки, являющиеся для него мишенями, не идентифицированы, и механизмы, с помощью которых такие факторы могут вызывать трансформацию, еще не определены. Один из главных вопросов, на который вряд ли удастся ответить, исходя из прямого участия таких факторов в трансформации клеток-мишеней, состоит в том, почему при поликлональной интеграции провируса имеет место моноклональный рост культуры [45]. Можно предположить, что одни клетки, имеющие преимущества для роста по сравнению с другими, в конце концов становятся преобладающими в культуре. Однако не вполне ясно, каким образом эти клетки приобретают преимущества для роста, если участки интеграции не имеют значения и если культура получила начало из однородной клеточной популяции.

### Влияние HTLV-I на иммунные функции Т-клеток

Существует много данных, позволяющих думать, что при заражении клеток Т-тропными ретровирусами повреждаются нормальные иммунные функции Т-клеток. При естественном зараже-



нии кошек вирусами лейкоза кошек (FeLV) у них наблюдается глубокое угнетение иммунной системы [163]. Инфекция проявляется в: лимфопении [30]; атрофии тимуса [1]; угнетении клеточного иммунного ответа [107]; угнетении гуморального иммунного ответа на Т-зависимые антигены [163]; увеличении частоты заражения некоторыми оппортунистическими агентами, которыми могут быть бактерии, грибы, простейшие или вирусы [30]; повышении уровня некоторых видов раковых заболеваний в дополнение к лейкозу [172]; генерализованной лимфоаденопатии [33]. Большая часть кошек погибает от последствий развивающейся в результате заражения FeLV иммунной дисфункции, а не от самого лейкоза [33].

Заражение HTLV-I также, по-видимому, приводит к потере многих иммунных функций Т-клеток. Эссекс и сотр. [33] обнаружили, что у больных в эндемичных по HTLV-I районах Японии, находящихся в палатах для инфекционных больных, антитела к HTLV-I встречаются почти в три раза чаще, чем у обычного населения района. Естественный контакт с вирусом, по-видимому, делает население чувствительным к различным оппортунистическим инфекциям.

Митцуя и др. [99] показали, что Т-клеточная линия, происходящая от зараженного HTLV-I и прожившего длительное время больного, обладала специфической цитотоксической активностью к экспрессирующим HTLV-I и неопластическим Т-клеткам, если опухолевые клетки-мишени экспрессировали по крайней мере один общий с клетками-эффекторами HLA-антиген (HLA-A1). Однако клон (K7), происходящий от этой родительской линии, по-видимому, утратил свои нормальные иммунные функции. При контакте с опухолевыми клетками, экспрессирующими антигены HTLV-I, эта клональная популяция переставала пролиферировать и в конце концов погибала [98]. Было обнаружено, что этот отклоняющийся от нормы Т-клеточный клон имел одну копию провируса HTLV-I на клетку (М. Clarke, неопубликованные данные).

Потеря иммунных функций может быть также прямо продемонстрирована *in vitro* на хелперных и цитотоксических Т-клетках после их заражения HTLV-I и HTLV-II [112]. До заражения линия клонированных человеческих Т-клеток пролиферировала и обеспечивала помощью В-клетки только в присутствии двух факторов — специфического растворимого антигена (гемоцианина моллюска *фисурелла*) и гистосовместимых антиген-презентирующих клеток (АПК). После заражения HTLV-I либо HTLV-II клетки этой линии отвечали усилением пролиферации и недискриминируемой стимуляцией поликлонального иммуноглобулина В-клетками независимо от гистосовместимости АПК и наличия растворимого антигена. Аналогичным образом заражение клона

нормальных цитотоксических Т-клеток HTLV вело к ослаблению или потере их цитотоксических функций [112]. Эти данные позволяют думать, что при заражении Т-клеток HTLV индуцируется иммунодефицит и происходит поликлональная активация В-клеток, а также что Т-лимфотропный ретровирус, возможно принадлежащий к семейству HTLV, обуславливает клинические проявления, известные как синдром приобретенного иммунодефицита.

## Часть II: HTLV-III

### КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) был определен в 1981 г. как особый клинический синдром, выявляемый оппортунистическими инфекциями или новообразованиями, которые осложняют лежащий в их основе дефект клеточной иммунной системы [15, 52, 94, 149]. Основным дефектом является количественное снижение популяции Т-хелперов [81, 95, 153]. Обнаружены некоторые группы населения с повышенным риском заболевания СПИДом: гомосексуалисты-мужчины; наркоманы, вводящие наркотики внутривенно; больные гемофилией; недавние иммигранты с Гаити; лица, имевшие гетеросексуальные половые контакты с вышеперечисленными группами; новорожденные, матери которых относятся к группам высокого риска; и лица, которым переливали кровь [21, 22, 24, 25, 29, 60, 71, 74, 111, 130, 167]. Центр по контролю заболеваний (CDC) разработал определение СПИДа, основанное на появлении оппортунистических инфекций и новообразований [15]. При ранней диагностике польза этого определения ограничена, так как первично оно было предназначено для идентификации СПИДа после развития вторичных инфекций, возникающих в результате Т-клеточного дефицита, и в нем не принимались во внимание детали клинических и эпидемиологических проявлений, наблюдаемых на ранних стадиях заболевания. Двумя распространенными клиническими проявлениями СПИДа у больных являются внепеченочная лимфоаденопатия и острые клинические проявления Т-клеточной недостаточности, связанные с абсолютным истощением Т-клеток [35]. У больных с генерализованной лимфоаденопатией и истощением Т-хелперов при последующем наблюдении выявляется развитие СПИДа [96]. Хотя эти симптомы не совпадают с определением СПИДа, выдвинутым CDC, эти часто наблюдаемые проявления Т-клеточной недостаточности могут иметь диагностическое значение.

Эпидемиологические особенности СПИДа позволили предположить, что в его этиологии играет роль переносимый инфекционный агент [37, 51]. У больных СПИДом часто обнаруживали

другие вирусы, в том числе вирус Эпштейна — Барр (EBV), цитомегаловирус (CMV), вирус гепатита В (HBV) и аденовирусы [16, 27, 28]. Во время инфекции у нормального хозяина эти вирусы часто угнетают иммунную систему [13, 161]. Высокая распространенность этих вирусов среди групп риска по СПИДу в сочетании с их способностью передаваться при половых контактах, с иглами при уколах и с кровью при переливании наводит на мысль, что один или несколько из этих вирусов могут играть какую-то роль в этиологии СПИДа либо служить кофактором, повышающим чувствительность хозяина к другому вирусу, вызывающему СПИД.

Представители ретровирусов Т-клеточного лейкоза/лимфомы человека (HTLV), среди которых чаще всего встречается и лучше всего охарактеризован HTLV-I, рассматривались как основные кандидаты на роль агентов, вызывающих СПИД. И действительно, HTLV-I и HTLV-II изолированы из культивированных Т-клеток, полученных от больного СПИДом [43; Popovic et al., неопубликованные данные], а провирусная ДНК HTLV-I идентифицирована в клеточной ДНК двух больных СПИДом [47]. Антитела к мембранному антигену клеток, зараженных HTLV-I (идентифицированному как продукт гена *env* HTLV-I), часто определялись в сыворотках больных СПИДом [31, 32]. HTLV-I и HTLV-II Т-лимфотропны, преимущественно заражают клетки хелперного фенотипа (ОКТ4/leu 3a+) и в естественных условиях передаются от человека к человеку при половых контактах, с кровью или с препаратами крови (обзор см. [38]. Более того, HTLV-I и его варианты эндемичны в Африке и, возможно, возникли там [44]. СПИД также мог возникнуть в Африке. Аналогично некоторым другим ретровирусам, например вирусу лейкоза кошек, заражение HTLV влияет на функции Т-лимфоцитов, а зараженные им клетки вырабатывают много факторов клеточной регуляции, в том числе факторы, обладающие супрессорной активностью [133].

## ИНФЕКЦИОННЫЙ АГЕНТ

### Выделение HTLV от больных СПИДом и пре-СПИДом

В редких случаях из тканей, полученных от больных СПИДом и пре-СПИДом, были изолированы ретровирусы, классифицированные как HTLV-I и HTLV-II [Popovic et al., неопубликованные данные]. Вместе с тем от этих больных с высокой частотой были изолированы ретровирусы, принадлежащие к новой подгруппе HTLV. Эти вирусы, названные HTLV-III, имеют ряд свойств, общих с HTLV-I и HTLV-II, а именно: избирательную



тропность к лимфоцитам ОКТ4/leu 3a+, зависимость активности обратной транскриптазы от содержания  $Mg^{2+}$ , сходные размеры и содержание структурных белков, некоторые иммунологические перекресты между антигенами HTLV-III и такими же антигенами других подгрупп, ограниченную гомологию нуклеиновых кислот (табл. 32.5). Первые из этих изолятов были получены в нашей

Таблица 32.5. Взаимосвязь между HTLV-III, HTLV-I и HTLV-II

Свойства	HTLV		
	I	II	III
Общая инфекционность	Лимфоциты	Лимфоциты	Лимфоциты
Узкая тропность	T4	T4	T4
Обратная транскриптаза	~100K	~100K	~100K
Дивалентные катионы, предпочитаемые обратной транскриптазой	$Mg^{2+}$	$Mg^{2+}$	$Mg^{2+}$
Мажорный белок сердцевин	p24	p24	p24
Общий эпитоп оболочки	+	+	+
Общий эпитоп p24	+	+	+
Гомология РНК с РНК HTLV-I (при «строгих» условиях)		±	—
Гомология РНК с РНК HTLV-I (при умеренно «строгих» условиях)		++	+
Гомология с другими ретровирусами, кроме PTLV	0	0	0
pX	+	+	+
Образование гигантских многоядерных клеток	+	+	+

лаборатории в ноябре 1982 г. В связи с трудностью выращивания Т-клеток, зараженных этими новыми вирусами, адекватная характеристика их была затруднительна и публикация результатов была отложена до получения пермиссивного субклона перманентно растущей Т-клеточной линии, которую можно было бы заражать HTLV-III и которая давала бы большие количества вируса. Подобно ретровирусам типа C, HTLV-III почкуется от клеточной мембраны, но имеет несколько удлиненную сердцевину (рис. 32.4). Доступность больших количеств вируса позволила разработать иммунологические реагенты и методы исследования нуклеиновых кислот для детальной характеристики и сравнения вирусов HTLV [116].

От большого количества больных СПИДом и пре-СПИДом были собраны, обработаны и испытаны на наличие вируса или присутствие антител к вирусным белкам периферическая кровь, костный мозг и сыворотки. Вирус из свежего материала от больных, например периферической крови или лимфоцитов костного

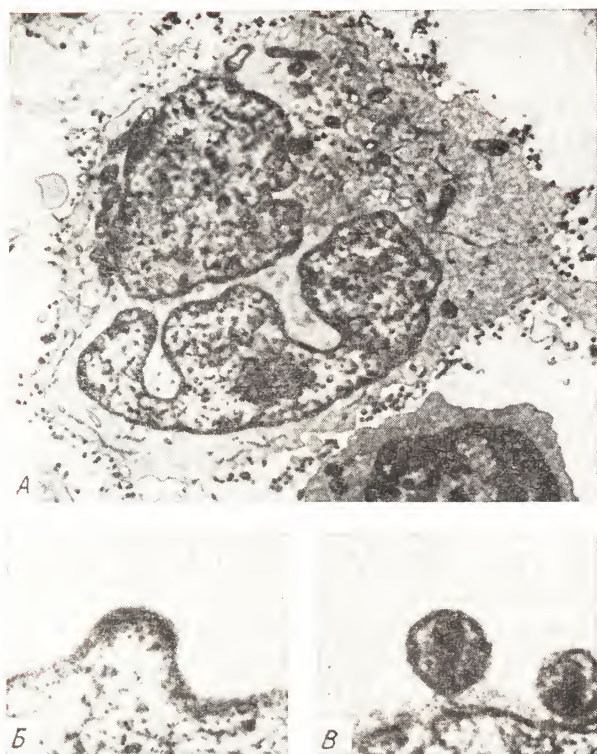


Рис. 32.4. Электронная микрофотография клеток, зараженных HTLV-III (А). Показан почкующийся вирус (Б) и зрелый вирион (В).

мозга, выделяли с использованием методов, разработанных для HTLV-I и HTLV-II. Свежие клетки отделяли от эритроцитов, стимулировали в течение 48—72 ч митогеном (ФГА-Р) и выращивали в среде с добавлением ТКФР. Для определения вируса использовали следующие процедуры: а) регистрацию активности вирусной обратной транскриптазы в надосадочной жидкости; б) перенос вируса в свежие нормальные человеческие Т-лимфоциты, например из плацентарной крови, периферической крови взрослых или из костного мозга; в) электронно-микроскопическое наблюдение фиксированных срезов клеток; г) исследование экспрессии антигена путем непрямой иммуофлуоресценции или радиоиммунопреципитации с применением сывороток от имеющих антитела доноров или гипериммунных сывороток против очищенного вируса [42].

Таблица 32.6. Изоляты HTLV-III, выделенные от больных СПИДом и пре-СПИДом и от здоровых с риском СПИДа

Больные и доноры <sup>1</sup>	Диагноз	Число изолятов HTLV-III <sup>2</sup>
Гомосексуалисты	СПИД	33
Мужчины	пре-СПИД	18
	Здоровые	13
Негомосексуалисты	пре-СПИД	2
Наркоманы	СПИД	4
Гемофилики и реципиенты крови	пре-СПИД	1
Дети	СПИД	3
	пре-СПИД	1
Матери детей, больных СПИДом	СПИД	1
	пре-СПИД	1
	Здоровые	2
Мужчины, имеющие беспорядочные половые связи (без других факторов риска)	СПИД	2
Супруги больных СПИДом и пре-СПИДом	пре-СПИД	6
	»	1
	Здоровые	2
Случайные доноры (125 случаев)	»	0

<sup>1</sup> Сыворотки всех (кроме трех) приведенных здесь больных или доноров были положительными на HTLV-III-антитела.

<sup>2</sup> Выделение вируса зависело от состояния клеток, здоровья доноров и т. д. В случае СПИДа — 50%-ное выделение вируса, в случае пре-СПИДа — 80%-ное.

Как суммировано в табл. 32.6, HTLV-III был изолирован из клеток, полученных от большого количества больных СПИДом и пре-СПИДом, а также от нескольких клинически нормальных носителей. Например, HTLV-III был выделен от 4 из 28 доноров-гомосексуалистов, не имевших беспорядочных половых контактов, и от 4 из 6 гомосексуалистов с высоким риском СПИДа. У одного из этой группы позднее развился СПИД. HTLV-III не был обнаружен в 125 пробах от нормальных гетеросексуальных доноров. От больных СПИДом вирус был выделен в 50% случаев, а от больных пре-СПИДом — в 30%. Ясно, что этот процент выделения вируса из образцов, взятых от больных СПИДом, дает заниженную оценку истинной частоты его содержания, так как во многих образцах, особенно полученных от умирающих больных, было очень мало жизнеспособных клеток. Например, при использовании свежевыделенных образцов от лиц, находящихся в состоянии пре-СПИДа вирус был выделен от 14 доноров подряд [119]. Доказательства контакта с вирусом у большей части этих больных (>90%) были получены путем тестирования положительных реакций сывороток, обсуждаемого ниже.



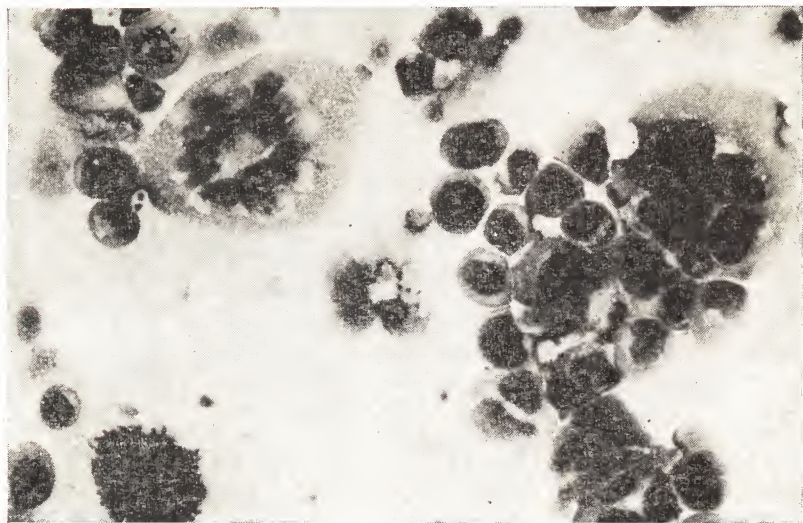


Рис. 32.5. Свежие выделенные лимфоциты человека, зараженные HTLV-III; видны типичные многоядерные гигантские клетки.

### Биологические свойства

В отличие от опыта, накопленного с HTLV-I и HTLV-II, в случае HTLV-III наиболее эффективным был перенос свободного вируса в свежие лимфоциты человека; при этом заражались не только лимфоциты плацентарной крови или костного мозга, но и лимфоциты периферической крови нормальных взрослых. Так же как в случае HTLV-I и HTLV-II, первичной мишенью для HTLV-III *in vitro*, по-видимому, были Т-клетки ОКТ4/leu 3a+. Обычным следствием заражения HTLV-III был взрыв продукции вируса, как правило, через одну-две недели после заражения, а также выраженный цитопатический эффект в зараженных клетках. На рис. 32.5 показано формирование поликарионов в клетках Т4+, зараженных HTLV-III. Размножение вируса в зараженных клетках самоограничивается и зависит от длительности выживания зараженных клеток. Пример действия HTLV-III на мононуклеарные клетки периферической крови человека иллюстрирует рис. 32.6. После заражения в течение первых 2—3 недель общее число жизнеспособных клеток постепенно снижается. При внимательном наблюдении за субпопуляциями инфицированных Т-клеток можно видеть четкий эффект в отношении клеток фенотипа ОКТ4/leu 3a+. После заражения HTLV-III эти клетки быстро гибнут (см. также рис. 32.6). Ряд данных указывает на то, что

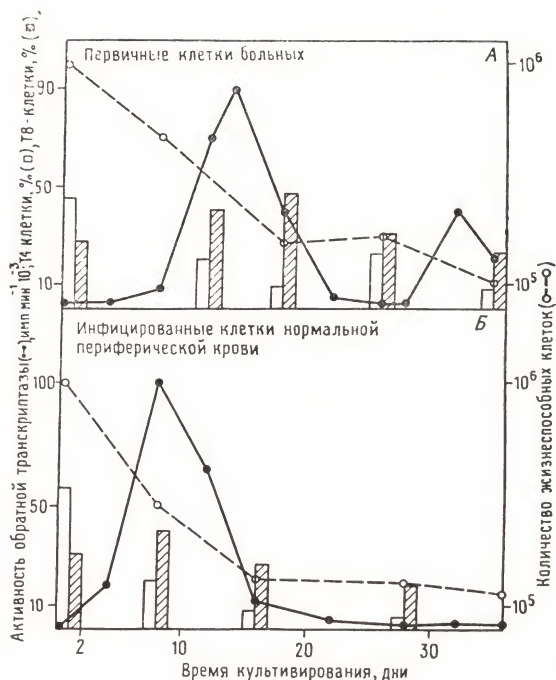


Рис. 32.6. Характеристики первично (А) и вторично зараженной (Б) культуры Т-лимфоцитов, продуцирующих HTLV-III. В культуре определяли (как функцию времени) количество жизнеспособных клеток, долю ОКТ4+ и ОКТ8+, активность клеточной и внеклеточной обратной транскриптазы. Процедуры инициации первичной клеточной культуры из крови больных и переноса вируса в незараженные клетки описаны в тексте.

клетки других фенотипов, отличных от ОКТ4/leu 3+, например моноциты и В-лимфоциты, также заражаются HTLV-III с очень низким уровнем выхода вируса; возможно, они служат резервуаром вируса при естественном заболевании. Однако, как описано ранее, некоторые перевиваемые лейкозные Т-клеточные линии человека также могут продуктивно заражаться HTLV-III. Доказано, что эти клеточные линии представляют собой ценный источник вируса для приготовления реагентов, играющих критическую роль в идентификации и определении свойств HTLV-III. Другими исследователями, независимо от нас, были обнаружены ретровирусы, подобные принадлежащим к группе HTLV-III. Например, вирус, обозначенный как вирус лимфоаденопатии (LAV), был выделен Барре-Синусси и др. [4] от больного лимфоаденопатией. Та же группа исследователей сообщила также о получении дополнительных изолятов, названных IDAV, от больных СПИДом

[168]. Предварительные сравнения этих вирусов с HTLV-III свидетельствуют о тесной связи между ними. О выделении HTLV-III сообщается также еще в одной работе [36].

## Связь HTLV-III с HTLV-I и HTLV-II

### Антигенные свойства

При анализе очищенного в градиенте плотности сахарозы HTLV-III посредством электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле был выявлен белковый профиль, аналогичный подобному профилю HTLV-I и HTLV-II с некоторыми незначительными различиями. Хорошо заметные, окрашенные кумасси синим полосы были обнаружены в позициях, соответствующих 40—46, 24 и 15—17К. Вероятно, они соответствуют гликопротеину оболочки и мажорным белкам *gag*. Проведен сравнительный анализ антигенных свойств HTLV-III, HTLV-I и HTLV-II с использованием вестерн-блоттинга. Лизаты HTLV-I, HTLV-II и HTLV-III подвергали электрофорезу в пластинах полиакриламидного геля и белковые полосы переносили на нитроцеллюлозу. Затем перенесен-

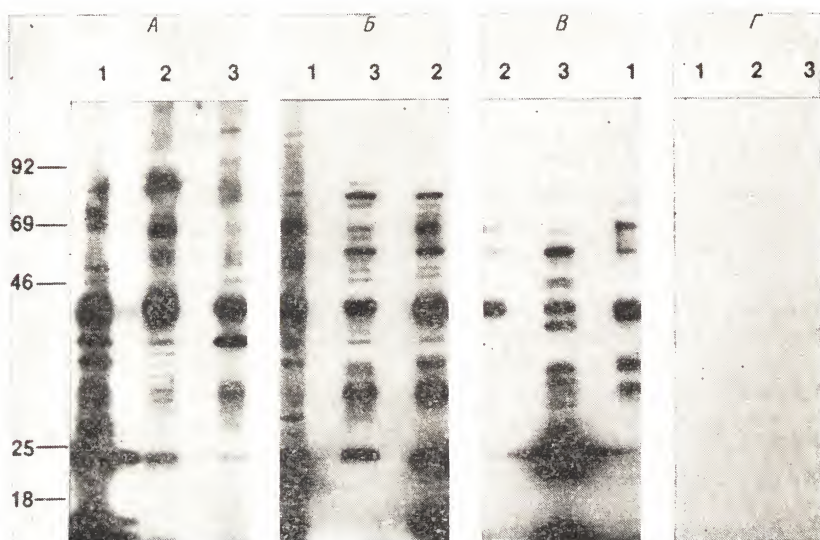


Рис. 32.7. Анализ антигенной перекрестной реактивности между членами семейства HTLV. Каждая панель представляет вестерн-блот HTLV-I (дорожка 1), HTLV-II (дорожка 2) и HTLV-III (дорожка 3). На блоты наносили кроличью сыворотку к HTLV-I (А), HTLV-II (Б), HTLV-III (В) и нормальную кроличью сыворотку (Г). Иммунные реакции были выявлены с помощью меченных  $^{125}\text{I}$  козьих противокроличьих IgG и радиоавтографии.



ный материал обрабатывали кроличьими антисыворотками против HTLV-I, HTLV-II и HTLV-III. Результаты (рис. 32.7) показали следующую перекрестную реактивность антигена р24 между вирусами: хотя сильнее всего антитела реагировали с гомологичными белками, умеренная реактивность наблюдалась между р24 HTLV-I и антителами к HTLV-II, а также между р24 HTLV-III и антителами к HTLV-II; слабые реакции наблюдались между р24 HTLV-I и антителами к HTLV-III. Перекрестная реактивность р24 HTLV-II и HTLV-III, по-видимому, односторонняя, поскольку не было отмечено значительной реакции между антителами к HTLV-III и р24 HTLV-II [136].

Конкурентный радиоиммуноанализ р24 HTLV-III показал, что HTLV-III является уникальным ретровирусом, главный белок сердцевины которого (р24) не родствен белкам большинства других ретровирусов, р24 HTLV-III имеет низкий, но регистрируемый уровень перекрестной реактивности с HTLV-I и HTLV-II, но не с другими ретровирусами, причем при вестерн-блоттинге эта перекрестная реактивность видна более четко, чем при радиоиммунологическом тесте. Подобным же образом вестерн-блоттингом выявляется перекрестная реактивность между р24 HTLV-I и р24 BLV [105], тогда как при конкурентном радиоиммуноанализе она не обнаруживается [75, 78]. Ясно, что HTLV-I и HTLV-II более родственны между собой, чем HTLV-III с любым из них.

### Свойства нуклеиновых кислот

Геном HTLV-III клонирован из клеточной линии H9/HTLV-III, продуцирующей вирус в высоком титре с использованием трех подходов. а) Клоны кДНК были получены из рекомбинантной плазмидной библиотеки двухцепочечных кДНК, транскрибированных с очищенной вирионной РНК при использовании в качестве затравки oligo(dT) [2]. Эти клоны представляют последовательности длиной от 1 до 2 kb с 3'-конца вирусного генома. б) Клоны неинтегрированного провируса получены из рекомбинантной фаговой библиотеки, содержащей последовательности ДНК (надосадочная жидкость по Хирту) остро инфицированных клеток H9. В результате детального анализа трех клонов было выявлено, что они содержат один геном полной длины и два фрагмента, которые, возможно, составляют один полный геном [57]. в) Из библиотеки геномной ДНК клеток H9/HTLV-III были получены клоны интегрированного провируса с фланкирующими клеточными последовательностями [148]. Анализ этих клонов и скрининг ДНК из клеток, зараженных HTLV-III, или из свежих тканей больных СПИДом методом гибридизации по Саузерну указывает на широкую вариацию HTLV-III. Подобный полимор-

физм не характерен для HTLV-I и HTLV-II [176]. Не исключено, что за повышенный полиморфизм HTLV-III ответственна его высокорепликативная природа. Гомология между HTLV-III и другими подгруппами HTLV-I была проанализирована методом Саузерн-гибридизации и картированием гетеродуплексов. Результаты выявили значительную гомологию области *gag-pol* и отдаленную, но все еще специфическую гомологию в области *pX*. Размер генома HTLV-III и наличие гомологии в области *pX* позволяют предположить, что этот вирус также имеет дополнительные последовательности, характерные для членов семейства HTLV.

При использовании генома HTLV-III в качестве зонда не было обнаружено гибридизации с ДНК клеток HT или их клональных производных Н4 и Н9, а также с ДНК из человеческих тканей, что указывает на экзогенное происхождение вируса и на то, что он не содержит клеточных генов.

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

### Сывороточная эпидемиология

На наличие антител к HTLV-III проанализировано большое количество сывороток больных СПИДом, лиц, которые имеют признаки и симптомы, часто предшествующие СПИДу, гомосексуалистов, гемофиликов и нормальных контрольных доноров. При этом использовали следующие методы: а) иммуносорбционный ферментный анализ (ELISA); б) анализ вестерн-блоттингом и в) радиоиммунопреципитацию очищенного р24 HTLV-III. В системе ELISA разрушенный детергентно-солевой обработкой HTLV-III реагирует с исследуемыми сыворотками в лунке панели для микротитрования. Иммунореактивность определяют, используя меченные ферментами вторые антитела к человеческим иммуноглобулинам. При анализе вестерн-блоттингом вирусные антигены разделяют электрофоретически в ДСН-полиакриламидном геле, а затем белковые полосы переносят на нитроцеллюлозные листы, разрезают их на продольные полоски, содержащие характерные профили вирусных белков, и используют для скрининга сывороток. Пример вестерн-блоттинга показан на рис. 32.8. Сыворотки первоначально подвергали скринингу в системе ELISA. Отрицательные в этой системе сыворотки повторно скринировали вестерн-блоттингом. Сыворотки считали положительными по антителам, если они положительно реагировали либо в системе ELISA, либо при вестерн-блоттинге, даже если первоначально в системе ELISA они были отрицательными [132, 137].

При подобном скринировании двойным слепым методом отмечено 100% положительных сывороток у всех больных СПИДом и не выявлено ни одной положительной сыворотки в контрольной

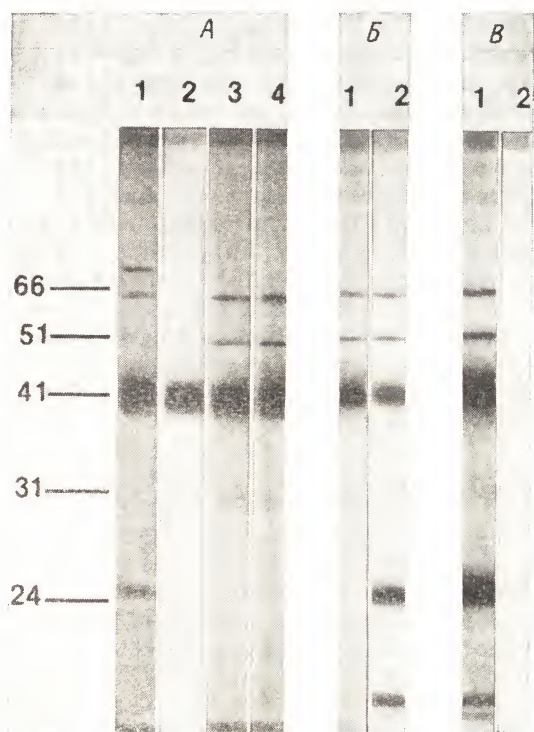


Рис. 32.8. Идентификация антигенов HTLV-III, распознаваемых сыворотками больных СПИДом. HTLV-III лизировали и фракционировали электрофорезом в пластине 12%-ного полиакриламидного геля в присутствии ДСН. Белковые полосы электрофоретически переносили из геля на нитроцеллюлозный лист и проводили твердофазный радиоиммуноанализ. Полоски нитроцеллюлозы промывали, высушивали, монтировали и экспонировали с рентгеновской пленкой. А. Сыворотки больных СПИДом. Б. Сыворотки больных с лимфоаденопатией. В. Положительная (полоска 1) и отрицательная (полоска 2) сыворотки гомосексуалистов-мужчин.

группе, куда были включены сыворотки от здоровых и от больных другими заболеваниями, не связанными со СПИДом [132]. В табл. 32.7 суммированы результаты, полученные в расширенных исследованиях, проведенных большим числом исследователей в клиниках разных частей света. Кроме подтверждения почти абсолютной корреляции между наличием антител к HTLV-III и СПИДом результаты указывают также на широкое распространение антител к HTLV-III среди больных с персистентной генерализованной лимфоаденопатией, лихорадкой, истощением и т. д. — т. е. при состояниях, описываемых как синдром лимфоаденопатии, пре-СПИД или комплекс, связанный со СПИДом



Таблица 32.7. Антитела к HTLV-III в сыворотках больных СПИДом или пре-СПИДом

Индивидуумы	Число положительных	Число проверенных	Доля положительных, %
Больные СПИДом	288	297	97
Больные пре-СПИДом	327	360	90,8
Бессимптомные гомосексуалисты-мужчины	96	235	40,9
Доноры крови из групп высокого риска	9	9	100
Реципиенты почки от доноров группы высокого риска	1	1	100
Контроли			
Случайные нормальные доноры	0	238	0
Чернокожие женщины из Балтимора (1962 г.)	0	100	0
Здоровые японцы из HTLV-эндемичного района	0	123	0
Больные лейкозами и другими злокачественными заболеваниями из эндемичного по HTLV-I района	0	34	0
Здоровые суринамцы (группа, леченная метадоном)	0	54	0
Шизофреники	0	30	0
Больные болезнью Ходжкина и их братья или сестры	0	160	0
Реципиенты почек	0	24	0
Другие случаи угнетения иммунитета	0	34	0
Смешанные больные <sup>1</sup>	0	82	0

<sup>1</sup> Сюда включены больные, которым делали интенсивное переливание крови, а также: гепатитом В, сифилисом в первой стадии, ревматоидным артритом, системной красной волчанкой, острыми мононуклеозами, лимфоидными лейкозами, В- и Т-клеточными лимфомами, зональной алопецией, идиопатической спленомегалией.

(КСП). К другим группам, имеющим антитела к HTLV-III, относится группа гомосексуалистов с беспорядочными связями и наркоманов, вводящих наркотики внутривенно. В отличие от этого у большого числа контрольных индивидуумов антитела к HTLV-III отсутствовали. Среди этих контрольных лиц были здоровые индивидуумы; лица, страдающие различными другими вирусными заболеваниями (например, цитомегаловирусным мононуклеозом и HTLV-I-положительной ТЛВ); индивидуумы с угнетенным иммунитетом (реципиенты почечных трансплантатов; больные с различными иммунодефицитными заболеваниями, включая синдром Вискотт — Олдрича, атаксию телангиэктазию, обычные гипогаммаглобулинемии и т. д.). Среди индивидуумов, не подверженных традиционным факторам риска СПИДа, анти-

тела к HTLV-III были определены у лиц, которым делали переливание крови или вводили компоненты крови [49, 55], у реципиентов почек от доноров, имевших антитела (табл. 32.7), а также у женщин, партнерами которых при половых контактах были мужчины, зараженные HTLV-III (Sarnghadharan et al., неопубликованные данные).

Эти исследования подтвердили непосредственную связь HTLV-III со СПИДом в качестве его этиологического агента.

### Способы передачи HTLV-III

Уже давно установлено, что СПИД передается преимущественно при половых контактах. С момента первого описания СПИДа как нового реально существующего заболевания ранее здоровых гомосексуалистов главным фактором риска, ведущим к приобретению этого заболевания, считают беспорядочную гомосексуальную активность. Кроме того, документировано несколько случаев заражения женщин от мужчин-бисексуалистов. Эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что степень риска зависит от особенностей сексуальной практики. Так, СПИД легче распространяется среди гомосексуалистов, играющих пассивную роль, чем среди их партнеров, играющих активную роль [48]. Критическим моментом заражения является перенос со спермой HTLV-III или клеток, зараженных HTLV-III. В переносе вируса могут участвовать также другие жидкости тела, например слюна. Вирус выделен из слюны 4 из 10 больных пре-СПИДом и 4 из 10 бессимптомных гомосексуалистов с высоким риском СПИДа (неопубликованные наблюдения в нашей лаборатории). Наиболее эффективно вирус передается при переливании зараженной крови. Заражение часто происходит также среди наркоманов, которые вводят себе наркотики нутривенно загрязненными иглами. Еще одна группа повышенного риска заражения — это дети зараженных вирусом матерей. Наиболее вероятный путь заражения в этом случае — трансплацентарный обмен кровью между матерью и плодом.

### ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Удалось обнаружить, выделить и охарактеризовать этиологические агенты для двух основных Т-клеточных заболеваний. Возникает вопрос: как можно использовать полученные результаты, как они могут помочь ограничить распространение этих заболеваний? Для ТЛВ и СПИДа характерно горизонтальное распространение ретровирусов. *In vitro* заражение HTLV-I вызывает пролиферацию Т-клеток и ведет к их иммортализации, а *in vivo* — к Т-клеточному лейкозу. Вместе с тем заражение HTLV-III *in vitro*

вызывает гибель и истощение по крайней мере некоторых Т-клеток-мишеней, а *in vivo* потерю иммунных функций. Каким образом два члена семейства ретровирусов, имеющих ряд общих структурных и функциональных свойств, дают такие разные эффекты? Ответ может быть найден, если проанализировать структурные элементы генов двух вирусов. Было бы интересно изучить влияние делеции или перестройки специфических участков какого-либо гена на способность вирусов трансформировать клетки или на цитопатический эффект этих вирусов. В этом отношении, возможно, наибольшего внимания заслуживают манипуляции, затрагивающие участок *pX*, особенно в связи с выдвинутым предположением о том, что у HTLV-I и HTLV-II он кодирует белок, который действует как транс-фактор, вызывающий иммортализацию зараженных клеток.

Цитопатический характер инфекции HTLV-III может означать, что связанные с иммунным ответом зараженные клетки в конечном счете исчезают и для сохранения зараженного состояния должны постоянно инфицироваться свежие клетки. По сообщениям ряда авторов, кроме Т-лимфоцитов могут заражаться и другие клетки. В отличие от ретровирусных лейкозов в случае СПИДа терапевтические подходы могут базироваться на предотвращении экспрессии вируса и заражения свежих клеток. Здесь могут оказаться полезными ингибиторы вирусных функций, влияющих на присоединение вируса к клеточной поверхности, проникновение или обратную транскрипцию, а также специфические антитела к гликопротеинам вирусной оболочки или клеточным рецепторам вируса или же избирательный мощный ингибитор обратной транскриптазы. Как для лейкозов, так и для СПИДа конечной целью является разработка безопасных вакцин. Если соответствующие белки оболочки вызывают образование вирус-нейтрализующих антител, то, вероятно, оптимально было бы использовать в качестве вакцин изолированные гликопротеины вируса или инактивированные вирусные препараты. Успешное клонирование генов HTLV-I и HTLV-III позволяет надеяться на получение этих белков в больших количествах.

## Литература

1. Anderson L. J., Jarrett W. F. H., Jarrett O., Laird H. M. (1971). Feline leukemia virus infection of kittens: mortality associated with atrophy of the thymus and lymphoid depletion, JNCI, 47, 807.
2. Arya S. K., Gallo R. C., Hahn B. H., Shaw G. M., Popovic M., Salhuddin S. Z., Wong-Staal F. (1984). Homology of genome of AIDS-associated virus (HTLV-III) with genomes of human T-cell leukemia viruses (HTLV-I and HTLV-II), Science, 225, 927—930.
3. Arya S. K., Wong-Staal F., Gallo R. C. (1984). T-cell growth factor gene: Lack of expression in human T-cell leukemia-lymphoma virus-infected cells, Science, 223, 1086—1087.



4. Barré-Sinoussi F., Chermann J. C., Rey F. et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science*, **220**, 868—871.
5. Blattner W. A., Blayney D. W., Robert-Guroff M. et al. (1983). Epidemiology of human T-cell leukemia/lymphoma virus, *J. Infect. Dis.*, **157**, 1406—1416.
6. Blattner W. A., Clark J. W., Gibbs W. N., Jaffe E. S., Robert-Guroff M., Saxinger W. C., Gallo R. C. (1984). HTLV: epidemiology and relationship to human malignancy. In: *Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus*, ed. by R. C. Gallo, M. Essex, and L. Gross, pp. 267—274, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
7. Blattner W. A., Kalyanaraman V. S., Robert-Guroff M., Lister T. A., Galton D. A. G., Sarin P. S., Crawford M. H., Catovsky D., Greaves M., Gallo R. C. (1982). The human type-C retrovirus, HTLV, in blacks from the Caribbean region, and relationship to adult T-cell leukemia/lymphoma, *Int. J. Cancer*, **30**, 257—264.
8. Blattner W. A., Takatsuki K., Gallo R. C. (1983). Human T-cell leukemia/lymphoma virus and adult T-cell leukemia, *JAMA*, **250**, 1074—1081.
9. Blayney D. W., Jaffe E. S., Fisher R. I., Schechter G. P., Cossman J., Robert-Guroff M., Kalyanaraman V. S., Blattner W. A., Gallo R. C. (1983). The human T-cell leukemia-lymphoma virus, lymphoma, lytic bone lesions, and hypercalcemia, *Ann. Intern. Med.*, **98**, 144—151.
10. Broder S., Bunn P. A. (1980). Cutaneous T-cell lymphomas, *Semin. Oncol.*, **7**, 310—331.
11. Broder S., Edelson R., Lutzner M., Nelson D., McDermott R., Durm M., Goldman C., Meade B., Waldmann T. A. (1976). The Sézary syndrome, *J. Clin. Invest.*, **58**, 1297—1306.
12. Bunn P. A., Schechter G. P., Jaffe E. et al. (1983). Clinical course of retrovirus-associated adult T-cell lymphoma in the United States, *N. Engl. J. Med.*, **309**, 257—264.
13. Carney W. P., Rubin R. H., Hoffman R. A., Hansen W. P., Healey K., Hirsch M. S. (1981). Analysis of T lymphocyte subsets in cytomegalovirus mononucleosis, *J. Immunol.*, **126**, 2114—2116.
14. Catovsky D., Greaves M. F., Rose M., Galton D. A. G., Goolden A. W. G., McCluskey D. R., White J. M., Lampert I., Bourikas G., Ireland R., Brownell A. I., Bridges J. M., Blattner W. A., Gallo R. C. (1982). Adult T-cell lymphoma-leukemia in blacks from the West Indies, *Lancet*, **1**, 639—642.
15. Centers for Disease Control Task Force on Kaposi's Sarcoma and Opportunistic Infections (1982): Epidemiological aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections, *N. Engl. J. Med.*, **306**, 248—252.
16. Cheeseman S. H., Sullivan J. L., Brettler D. B., Levine P. H. (1984). Analysis of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus antibody responses in treated hemophiliacs: implications for the study of acquired immunodeficiency syndrome, *JAMA*, **252**, 83—85.
17. Cianiccolo G. J., Matthews T. J., Bolognesi D. P., Snyderman R. (1980). Macrophage accumulation in mice is inhibited by low molecular-weight products from murine leukemia viruses, *J. Immunol.*, **124**, 2900.
18. Clark S. C., Arya S. K., Wong-Staal W., Matsumoto-Kobayashi M., Kay R. M., Kaufman R. J., Brown E. L., Shoemaker C., Copeland T., Oroszland T., Oroszland S., Smith K., Sarngadharan M. G., Lindner S. G., Gallo R. C. (1984). Human T-cell growth factor: partial amino acid sequence, cDNA cloning, and organization and expression in normal and leukemic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2543—2547.
19. Clarke M., Gelmann E. P., Reitz M. S. (1983). Homology of the human T-cell leukemia virus envelope gene with a class I HLA gene, *Nature*, **292**, 31—35.

20. Clarke W. F., Westin E., Schmidt D., Josephs S. F., Ratner L., Wong-Staal F., Gallo R. C., Reitz M. S. (1984). A human *c-sis* cDNA clone from a human T-cell leukemia virus infected cell line transforms NIH 313 cells, *Nature*, **308**, 464—467.
21. Clumeck N., Mascart-Lemone F., de Maubeuge J., Brenez D., Mascelis L. (1983). Acquired immune deficiency syndrome in black Africans, *Lancet*, **1**, 642.
22. Clumeck N., Sonnet J., Taelman H. et al. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome in African patients, *N. Engl. J. Med.*, **310**, 492—497.
23. Copeland T. D., Oroszlan S., Kalyanaraman V. S., Sarngadharan M. G., Gallo R. C. (1983). Complete amino acid sequence of human T-cell leukemia virus structural protein p15, *FEBS Lett.*, **162**, 390—395.
24. Curran J. W., Lawrence D. N., Jaffe H. et al. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusions, *N. Engl. Med.*, **310**, 69—75.
25. Davis K., Horsburgh C. R., Jr., Hasiba V., Shocket A. L., Kirkpatrick C. H. (1983). Acquired immunodeficiency syndrome in patient with hemophilia, *Ann. Intern. Med.*, **98**, 284—286.
26. Doolittle R. F., Hunkapillar M. W., Hood L. E., Devare S. G., Robbins K. C., Aaronson S. A., Antoniades H. N. (1983). Simian sarcoma virus *onc* gene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor, *Science*, **221**, 275—277.
27. Drew W. L., Conant M. A., Miner R. C. et al. (1982). Cytomegalovirus and Kaposi's sarcoma in young homosexual men, *Lancet*, **2**, 125—127.
28. Drew W. L., Mintz L., Miner R. C., Sands M., Ketterer B. (1981). Prevalence of cytomegalovirus infection in homosexual men, *J. Infect. Dis.*, **148**, 188—192.
29. Elliott J. L., Hoppes W. L., Platt M. S. et al. (1983). The acquired immunodeficiency syndrome and *Mycobacterium avium-intracellulare* bacteremia in a patient with hemophilia, *Ann. Intern. Med.*, **98**, 290—293.
30. Essex M., Hardy W. D., Jr., Cotter S. M., Jakowski R. M., Sliski A. (1975). Naturally occurring persistent feline oncornavirus infections in the absence of disease, *Infect. Immun.*, **11**, 470.
31. Essex M., McLane M. F., Lee T. H., Falk L., Howe C. W. S., Mullins J. I., Cabradilla C., Francis D. P. (1983). Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS, *Science*, **220**, 859—862.
32. Essex M., McLane M. F., Lee T. H. et al. (1983). Antibodies to human T-cell leukemia virus membrane antigens (HTLV-MA) in hemophiliacs, *Science*, **221**, 1061—1064.
33. Essex M. E., McLane M. F., Tachibana N., Francis D. P., Lee T.-H. (1984). Seroepidemiology of human T-cell leukemia virus in relation to immunosuppression and the acquired immunodeficiency syndrome, In: *Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus*, ed. by R. C. Gallo, M. Essex, and L. Gross, pp. 355—362, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
34. Evans B. L., Stein S. S., Francis D. P. et al. (1983). Antibodies to human T-cell leukemia virus associated membrane antigens in haemophiliacs: evidence for infection before 1980, *Lancet*, **2**, 698—700.
35. Fauci A. S., Macher A. M., Longo D. L. et al. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiological clinical, immunologic and therapeutic considerations, *Ann. Intern. Med.*, **100**, 92—106.
36. Feorino P. M., Kalyanaraman V. S., Haverkos H. W. et al. (1984). Lymphadenopathy associated virus infection of a blood donor-recipient pair with acquired immunodeficiency syndrome, *Science*, **225**, 69—72.
37. Francis D. P., Curran J. W., Essex M. (1983). Epidemic acquired immune deficiency syndrome: epidemiologic evidence for a transmissible agent, *JNCI*, **71**, 1—4.

38. Gallo R. C. (1984). Human T-cell leukemia-lymphoma virus and T-cell malignancies in adults. In: *Cancer Surveys*, Vol. 3, ed. by L. M. Franks, L. M. Wyke, and R. A. Weiss, pp. 113—159, Oxford University Press, Oxford.
39. Gallo R. C., Reiz M. S. (1978). Molecular probes for tumor viruses in human cancer, *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **18**, 1—58.
40. Gallo R. C., Mann D., Broder S., Ruscetti F. W., Maeda M., Kalyanaraman V. S., Robert-Guroff M., Reiz M. S. (1982). Human T-cell leukemia/lymphoma virus (HTLV) is in T- but not B-lymphocytes from a patient with cutaneous T-cell lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4680—4683.
41. Gallo R. C., Kalyanaraman V. S., Sarngadharan M. G., Sliski A., Vonderheid E. C., Maeda M., Nakao Y., Yamada K., Ito Y., Gutensohn N., Murphy S., Bunn P. A., Jr., Catovsky D., Greaves M. F., Blayney D. W., Blattner W., Jarrett W. F. H., zur Hausen H., Seligmann M., Brouet J. C., Haynes B. F., Jegasothy B. V., Jaffe E., Cossman J., Broder S., Fisher R. I., Golde D. W., Robert-Curoff M. (1983). Association of the human type-C retrovirus with a subset of adult T-cell cancers, *Cancer Res.*, **43**, 3892—3899.
42. Gallo R. C., Salahuddin S. Z., Popovic M., Shearer G. M., Kaplan M., Haynes B. F., Palker T. J., Redfield R., Oleske J., Safai B., White F., Foster P., Markham P. D. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS, *Science*, **224**, 500—503.
43. Gallo R. C., Sarin P. S., Gelmann E. P., Robert-Guroff M., Richardson E., Kalyanaraman V. S., Mann D. L., Sidhu G., Stahl R. E., Zolla-Pazner S., Leibowitch J., Popovic M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science*, **220**, 865—867.
44. Gallo R. C., Sliski A., Wong-Staal F. (1983). Origin of human T-cell leukemia-lymphoma virus, *Lancet*, **2**, 962—963.
45. Gandori C., Popovic M., Macchi B., Bonmassar E., Wong-Staal F., Gallo R. C. (1984). Defective components of human T-cell leukemia virus-1 and kinetics of viral transmission in vitro, Submitted for publication.
46. Gelman E. P., Franchini G., Manzari V., Wong-Staal F., Gallo R. C. (1984). Molecular cloning of a new unique T-leukemia virus (HTLV-II<sub>Mo</sub>), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 993—997.
47. Gelman E. P., Popovic M., Blayney D., Mazur H., Sidhu G., Stahl R. E., Gallo R. C. (1983). Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia/lymphoma virus in two patients with AIDS, *Science*, **220**, 862—865.
48. Goedert J. J., Sarngadharan M. G., Biggar R. J., Weiss S. H., Grossman R. J., Greene M. H., Bodner A., Mann D. L., Strong D. M., Gallo R. C., Blattner W. A. (1984). Determinants of retrovirus (HTLV-III) antibody and of immunodeficiency conditions in homosexual men, *Lancet*, **2**, 711—716.
49. Goedert J. J., Eyster M. E., Sarngadharan M. G., Weiss S. H., Gallo R. C., Blattner W. A. (1985). Antibodies reactive with human T-cell leukemia viruses in the serum of hemophiliacs receiving factor VIII concentrate, *Blood*, **65**, 492—495.
50. Gootenberg J. E., Ruscetti F. W., Mier J. W., Gazdar A. F., Gallo R. C. (1981). Human cutaneous T-cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T-cell growth factor, *J. Exp. Med.*, **154**, 1403—1418.
51. Gottlieb M. S., Groopman J. E., Weinstein W. M., Fahey J. L., Detels R. (1983). The acquired immunodeficiency syndrome, *Ann. Intern. Med.*, **99**, 208—220.
52. Gottlieb M. S., Schroff R., Schanker H. M. et al. (1981). *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency, *N. Engl. J. Med.*, **305**, 1425—1431.



53. Greaves M. F., Verbi W., Tilley R., Lister T. A., Habeshaw J., Guo H.-G., Trainor C. D., Robert-Guroff M., Blattner W., Reitz M., Gallo R. C. (1984). Human T-cell leukemia virus (HTLV) in the United Kingdom, *Int. J. Cancer*, **33**, 795—806.
54. Greene W. C., Robb R. J. (1985). Receptors for T-cell growth factor: structure, function, and expression on normal and neoplastic cells. In: *Contemporary Topics in Molecular Immunology*, Vol. 10, pp. 1—34, ed. by S. Gillis and F. P. Inman, Plenum Press, New York.
55. Groopman J. E., Salahuddin S., Sarngadharan M. G., Mullins J., Sullivan J. L., Mulder C., O'Hara C., Cheeseman S., Haverkos H., Forgacs P., Riedel N., McLane M. F., Essex M., Gallo R. C. (1984). Virologic studies in a case of transfusion associated AIDS, *N. Engl. J. Med.*, **311**, 1419—1422.
56. Guo H.-G., Wong-Staal F., Gallo R. C. (1984). Novel viral sequences related to a human T-cell leukemia virus in T-cell of a sero-positive baboon, *Science*, **223**, 1195.
57. Hahn B. H., Shaw G. M., Arya S. K., Popovic M., Gallo R. C., Wong-Staal F. (1984). Molecular cloning and characterization of the virus associated with AIDS (HTLV-III), *Nature*, **312**, 166—169.
58. Hanaoka M. (1981). Clinical pathology of adult T-cell leukemia, *Acta Haematol. (Jpn.)*, **44**, 1420—1430.
59. Hardy W. D., McClelland A. J., Zuckerman E. E., Snyder H. W., Francis D. P., Essex M. (1980). Immunology and epidemiology of feline leukemia virus nonproducer lymphomas. In: *Viruses in Naturally Occurring Cancers*, ed. by M. Essex, G. Todaro, and H. zur Hausen, Vol. 7, pp. 677—669, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
60. Harris C., Small C. B., Klein R. S. et al. (1983). Immunodeficiency in female sexual partners of men with the acquired immunodeficiency syndrome, *N. Engl. J. Med.*, **308**, 1181—1184.
61. Haseltine W. A., Sodroski J., Patarca R., Briggs D., Perkins D., Wong-Staal F. (1984). Structure of 3'-terminal region of type II human T lymphotropic virus: evidence for new coding region, *Science*, **225**, 419—421.
62. Hattori T., Uchiyama T., Toibana T., Takatsuki K., Uchino H. (1981). Surface phenotype of Japanese adult T-cell leukemia cells characterized by monoclonal antibodies, *Blood*, **58**, 645—647.
63. Haynes B. F., Miller S. W., Palker T. J., Moore J. O., Dunn P. H., Bolognesi D. P., Matzgar R. S. (1983). Identification of human T-cell leukemia virus in a Japanese patient with adult cell leukemia and cutaneous lymphomatous vasculitis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2054—2058.
64. Haynes B. F., Palker T. J., Robert-Guroff M., Kalyanaraman V. S., Gallo R. C., Bolognesi D. P., Searce M. (1984). Monoclonal antibodies against human T-cell leukemia-lymphoma virus p19 and p24 internal core proteins: spectrum of normal tissue reactivity and use as diagnostic probes. In: *Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus*, ed. by R. C. Gallo, M. Essex, and L. Gross, pp. 197—203, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
65. Haynes B. F., Robert-Guroff M., Matzgar R. S., Franchini G., Kalyanaraman V. S., Palker T., Gallo R. C. (1983). Monoclonal antibody against human T-cell leukemia virus p19 defines a human thymic epithelial antigen acquired during ontogeny, *J. Exp. Med.*, **157**, 907—920.
66. Hayward W. S., Neel B. G., Astrin S. M. (1981). Induction of lymphoid leukemia by avian leukosis virus: activation of a cellular «onc» gene by promoter insertion, *Nature*, **290**, 475—480.
67. Hebebrand L. C., Olsen R.-G., Mathes L. E., Nichols W. S. (1979). Inhibition of human lymphocyte mitogen and antigen response by a 15,000 dalton protein from feline leukemia virus, *Cancer Res.*, **39**, 443.
68. Hinuma Y., Komoda H., Chosa T., Kondo T., Kohakura M., Takenaka T., Kikuchi M., Ichimura M., Yunoki K., Sato I., Matsuo R., Takiuchi Y., Uchi-

- no H., Hanaoka M.* (1982). Antibodies to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nation-wide seroepidemiological study, *Int. J. Cancer.*, **29**, 631—635.
69. *Hinuma Y., Nagata K., Misoka M., Nakai M., Matsumoto T., Kinoshita K. I., Shirakawa S., Miyoshi I.* (1981). Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6476—6480.
  70. *Ihle J. N., Lee J. C.* (1982). Possible immunological mechanisms in C-type viral leukemogenesis in mice, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **98**, 85.
  71. *Jaffe H. W., Bergman D. J., Selik R. M.* (1983). Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases, *J. Infect. Dis.*, **148**, 339—345.
  72. *Jarrett W., Crawford E., Martin W., Davie F.* (1964). Leukemias in the cat: a virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma), *Nature*, **202**, 567—569.
  73. *Jarrett W., Martin B., Grighton W., Dalton R., Stewart M.* (1964). Leukemia in the cat: transmission experiments with leukemia (lymphosarcoma), *Nature*, **202**, 566—567.
  74. *Joncas J. H., Delage G., Chad Z., Lapointe N.* (1984). Acquired (or congenital) immunodeficiency syndrome in infants born of Haitian mothers, *N. Engl. J. Med.*, **308**, 842.
  75. *Kalyanaraman V. S., Jarvis-Morar M., Sarngadharan M. G., Gallo R. C.* (1984). Immunological characterization of the low molecular weight *gag* gene proteins p19 and p15 of human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV), and demonstration of human natural antibodies to them, *Virology*, **132**, 61—70.
  76. *Kalyanaraman V. S., Sarngadharan M. G., Bunn P. A., Minna J. D., Gallo R. C.* (1981). Antibodies in human sera reactive against an internal structural protein of human T-cell lymphoma virus, *Nature*, **294**, 271—273.
  77. *Kalyanaraman V. S., Sarngadharan M. G., Nakao Y., Ito Y., Aoki T., Gallo R. C.* (1982). Natural antibodies to the structural core protein (p24) of the human T-cell leukemia (lymphoma) retrovirus found in sera of leukemia patients in Japan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1653—1657.
  78. *Kalyanaraman V. S., Sarngadharan M. G., Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Gallo R. C.* (1981). Immunological properties of a type C retrovirus isolated from cultured human T-lymphoma cells and comparison to other mammalian retroviruses, *J. Virol.*, **38**, 906—915.
  79. *Kalyanaraman V. S., Sarngadharan M. G., Robert-Curoff M. et al.* (1982). A new subtype of human T-cell leukemia virus (human T-leukemia virus-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia, *Science*, **218**, 571—573.
  80. *Kikuchi K., Ogasawara M., Mikuni C.* (1981). Statistical analysis of immunologic, clinical and histopathologic data on lymphoid malignancies in Japan, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **11**, 15—38.
  81. *Lane H. C., Masur H., Edgar L. C., Whalen G., Rook A. H., Fauci A. S.* (1983). Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome, *N. Engl. J. Med.*, **309**, 453—458.
  82. *Le J., Vilc k J., Sadlik J. R., Cheung M. K., Balazs I., Sarngadharan M. G., Prenskey W.* (1983). Lymphokine production by human T-cell hybridomas, *J. Immunol.*, **130**, 1231—1235.
  83. *Lederman M. M., Ratnoff O. D., Scillian J. J., Jones P. K., Schacter B.* (1983). Impaired cell-mediated immunity in patients with classic hemophilia, *N. Engl. J. Med.*, **308**, 79—83.
  84. *Lee T. H., Coligan J. E., Homma T., McLane M. F., Tachibana N., Essex M.* (1984). Human T-cell leukemia virus-associated cell membrane antigens:

- identity of the major antigens recognized by the virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3856—3860.
85. Lee T. H., Coligan J. E., McLane M. F., Sodroski J. G., Popovic M., Wong-Staal F., Gallo R. C., Haseltine W., Essex M. (1984). Serological cross-reactivity between envelope gene products of type I and type II human T-cell leukemia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7579—7583.
86. Lee T. H., Coligan J. E., Sodroski J. A., Haseltine W. A., Salahuddin S. Z., Wong-Staal F., Gallo R. C., Essex M. (1984). Antigen encoded by the 3'-terminal region of human T-cell leukemia virus: evidence for a functional gene, *Science*, **226**, 57—61.
87. Leonard W. J., Depper J. M., Uchiyama T., Smith K. A., Waldman T. A., Greene W. C. (1982). A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for T-cell growth factor, *Nature*, **30**, 267—269.
88. Lindner S. G., Rahman R., Sarngadharan M. G., Gallo R. C. (1985). Purification of normal human T-cell growth factor to molecular homogeneity. In: *Modern Trends in Human Leukemia VI*, ed. by R. Neth, R. C. Gallo, M. F. Greaves, and G. Janka, Springer, Berlin (in press).
89. Lutzner M., Edelson R., Sckein P., Green I., Kirkpatrick C., Ahmed A. (1975). Cutaneous T-cell lymphomas: the Sézary syndrome, mycosis fungoides, and related disorders, *Ann. Intern. Med.*, **83**, 534—552.
90. Mann D. L., Popovic M., Sarin P. S., Murray C., Reitz M. S., Strong D. M., Haynes B. F., Gallo R. C., Blattner W. A. (1983). Cell lines producing human T-cell lymphoma virus show altered HLA expression, *Nature*, **305**, 58—60.
91. Manzari V., Wong-Staal F., Franchini G., Colombini S., Gelmann E. P., Oroszlan S., Staal S., Gallo R. C. (1983). Human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV): cloning of an integrated defective provirus and flanking cellular sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1574—1578.
92. Markham P. D., Salahuddin S. Z., Kalyaharaman V. S., Popovic M., Sarin P. S., Gallo R. C. (1983). Infection and transformation of fresh human umbilical cord blood cells by multiple sources of human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV), *Int. J. Cancer*, **31**, 413—420.
93. Markham P. D., Salahuddin S. Z., Macchi B., Robert-Guroff M., Gallo R. C. (1984). Transformation of different phenotypic types of human bone marrow T-lymphocytes by HTLV-I, *Int. J. Cancer*, **33**, 13—17.
94. Masur H., Michelis M. A., Greene J. B. et al. (1981). An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction, *N. Engl. J. Med.*, **305**, 1431—1438.
95. Mathur-Wagh U., Spigland I., Sacks H. S. et al. (1984). Longitudinal study of persistent generalized lymphadenopathy in homosexual men: relation to acquired immunodeficiency syndrome, *Lancet*, **1**, 1033—1038.
96. Metroka C. E., Cunningham-Rundles S., Pollack M. S. et al. (1983). Generalized lymphadenopathy in homosexual men, *Ann. Intern. Med.*, **99**, 585—591.
97. Mier J. W., Gallo R. C. (1980). Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte conditioned media, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6314—6318.
98. Mitsuya H., Broder S. (1984). Cytotoxic T-cells specific for human T-cell leukemia/lymphoma virus. In: *Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus*, ed. by R. C. Gallo, M. Essex, and L. Gross, pp. 229—235, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
99. Mitsuya H., Matis L. A., Megson M., Bunn P. A., Murray C., Mann D. L., Gallo R. C., Broder S. (1983). Generation of an HLA-restricted cytotoxic T-cell line reactive against cultured tumor cells from a patient infected with human T-cell leukemia/lymphoma virus, *J. Exp. Med.*, **158**, 994—999.
100. Miyoshi I., Kubonishi I., Yoshimoto S., Akagi T., Ohtsuki Y., Shirashi Y., Nagato K., Hinuma Y. (1981). Type C virus particles in a cord T-cell line



- derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukemic T-cells, *Nature*, **294**, 770—771.
101. Miyoshi I., Yoshimoto S., Fujishita M., Taguchi H., Kubonishi I., Niiya K., Minezawa M. (1982). Natural adult T-cell leukemia virus infection in Japanese monkeys, *Lancet*, **2**, 658—659.
  102. Morgan D. A., Ruscetti F. W., Gallo R. C. (1976). Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrow, *Science*, **193**, 1007—1008.
  103. Neel B. G., Hayward W. S., Robinson H. L., Fang J., Astrin S. M. (1981). Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion, *Cell*, **23**, 323—334.
  104. Nowell P. C. (1960). Phytohemagglutinin induces DNA synthesis in leukocyte cultures, *Cancer Res.*, **20**, 462—471.
  105. Oroszlan S., Copeland T. D., Kalyanaraman V. S., Sarngadharan M. G., Schultz A. M., Gallo R. C. (1984). In: Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus, ed. by R. C. Gallo, M. Essex, and L. Gross, pp. 101—110, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
  106. Oroszlan S., Sarngadharan M. G., Copeland T. D., Kalyanaraman V. S., Gilden R. V., Gallo R. C. (1982). Primary structure analysis of the major internal protein p24 of human type-C T-cell leukemia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1291—1294.
  107. Perryman L. E., Hoover E. A., Yohn D. S. (1972). Immunological reactivity of the cat: immunosuppression in experimental feline leukemia, *JNCT*, **49**, 1357.
  108. Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Gazdar A. F., Bunn P. A., Minna J. D., Gallo R. C. (1980). Detection and isolation of type-C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7415—7419.
  109. Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Mier J. W., Woods A. M., Gallo R. C. (1980). T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6815.
  110. Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Reitz M. S., Kalyanaraman V. S., Gallo R. C. (1981). Isolation of a new type-C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukemia, *Nature*, **294**, 268—271.
  111. Poon M. C., Landay A., Prasthofer E. F., Stagno S. (1983). Acquired immunodeficiency syndrome with *Pneumocystis carinii* pneumonia and *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in a previously healthy patient with classic hemophilia: clinical immunologic, and virologic findings, *Ann. Intern. Med.*, **98**, 287—290.
  112. Popovic M., Flomberg N., Volkman D. J., Mann D., Fauci A. S., Dupont B., Gallo R. C. (1984). Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II, *Science*, **226**, 459—462.
  113. Popovic M., Lange-Wantzin G., Sarin P. S., Mann D., Gallo R. C. (1983). Transformation of human umbilical cord blood T-cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5402—5406.
  114. Popovic M., Reitz M. S., Sarngadharan M. G., Robert-Guroff M., Kalyanaraman V. S., Nakao Y., Miyoshi Y., Minowada J., Yoshida M., Ito Y., Gallo R. C. (1982). The virus of Japanese adult T-cell leukemia is a member of the human T-cell leukemia virus group, *Nature*, **300**, 63—66.
  115. Popovic M., Sarin P. S., Robert-Guroff M., Kalyanaraman V. S., Mann D., Minowada J., Gallo R. C. (1983). Isolation and transmission of human retrovirus (human T-cell leukemia virus), *Science*, **219**, 856—859.
  116. Popovic M., Sarngadharan M. G., Read E., Gallo R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic human T lymphotropic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS, *Science*, **224**, 497—500.

117. *Posner L. E., Robert-Guroff M., Kalyanaraman V. S., Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Fossieck B., Bunn P. A., Jr., Minna J. D., Gallo R. C.* (1981). Natural antibodies to the human T-cell lymphoma virus in patients with cutaneous T-cell lymphoma, *J. Exp. Med.*, **154**, 333—346.
118. *Prival J., Paran M., Gallo R. C., Wu A. M.* (1974). Colony-stimulating factors in cultures of human peripheral blood cells, *JNCI*, **53**, 1583—1588.
119. *Redfield R. R., Salahuddin S. Z., Markham P. D., Folks T. M., Sarngadharan M. G., Wright D. C., James W. D., Gallo R. C.* (1985). The clinical course of AIDS-related complex (ARC) and the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) associated with HTLV-III infection, Submitted for publication.
120. *Reitz M. S., Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Gallo R. C.* (1981). Characterization and distribution of nucleic acid sequences of a novel type-C retrovirus isolated from neoplastic human T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1887—1891.
121. *Reitz M. S., Jr., Popovic M., Haynes B. F., Clark S. C., Gallo R. C.* (1983). Relatedness by nucleic acid hybridization of new isolates of human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) and demonstration of provirus in uncultured leukemic blood cells, *Virology*, **126**, 688—692.
122. *Rho H. M., Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Gallo R. C.* (1981). Characterization of the new reverse transcriptase from a new retrovirus (HTLV) produced by a cutaneous T-cell lymphoma cell line, *Virology*, **112**, 355—359.
123. *Robb R. J., Greene W. C.* (1983). Direct demonstration of the identity of T-cell growth factor binding protein and the Tac antigen, *J. Exp. Med.*, **158**, 1332—1337.
124. *Robb R. J., Munck A., Smith K. A.* (1981). T-cell growth factors: quantitation, specificity, and biological relevance, *J. Exp. Med.*, **154**, 1455—1474.
125. *Robert-Guroff M., Gallo R. C.* (1983). Establishment of an etiologic relationship between the human T-cell leukemia/lymphoma virus (HTLV) and adult T-cell leukemia, *Blut*, **47**, 1—12.
126. *Robert-Guroff M., Kalyanaraman V. S., Blattner W. A., Popovic M., Sarngadharan M. G., Maeda M., Blayney D., Catovsky D., Bunn P. A., Shibata A., Nakao Y., Ito Y., Aoki T., Gallo R. C.* (1983). Evidence for human T-cell lymphoma-leukemia virus infection of family members of human T-cell lymphoma-leukemia virus positive T-cell leukemia-lymphoma patients, *J. Exp. Med.*, **157**, 248—258.
127. *Robert-Guroff M., Nakao Y., Notake K., Ito Y., Sliski A., Gallo R. C.* (1982). Natural antibodies to human retrovirus HTLV in a cluster of Japanese patients with adult T-cell leukemia, *Science*, **215**, 975—978.
128. *Robert-Guroff M., Ruscetti F. W., Posner L. E., Poiesz B. J., Gallo R. C.* (1981). Detection of the human T-cell lymphoma virus p19 in cells of some patients with cutaneous T-cell lymphoma and leukemia using a monoclonal antibody, *J. Exp. Med.*, **154**, 1957—1964.
129. *Robert-Guroff M., Schüpbach J., Blayney D. W., Kalyanaraman V. S., Merino F., Lanier A., Sarngadharan M. G., Clark J., Saxinger W. C., Blattner W. A., Gallo R. C.* (1984). Sero-epidemiologic studies on HTLV-I. In: *Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus*, ed. by R. C. Gallo, M. Essex, and L. Gross, pp. 285—295, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
130. *Rubenstein A., Sicklick M., Gupta A. et al.* (1983). Acquired immunodeficiency with reversed T<sub>4</sub>T<sub>8</sub> ratios in infants born to promiscuous and drug-addicted mothers, *JAMA*, **249**, 2350—2356.
131. *Ruscetti F. W., Morgan D. A., Gallo R. C.* (1977). Functional and morphological characterization of human T-cells continuously grown in vitro, *J. Immunol.*, **119**, 131—138.

132. *Safai B., Sarngadharan M. G., Groopman J. E., et al.* (1984). Seroepidemiological studies of HTLV-III in AIDS, *Lancet*, **1**, 1438—1440.
133. *Salahuddin S. Z., Markham P. D., Lindner S. G., Gootenberg J., Popovic M., Hemmi H., Sarin P. S., Gallo R. C.* (1984). Lymphokine production by cultured human T-cells transformed by human T-cell leukemia-lymphoma virus, *Science*, **223**, 703—706.
134. *Salahuddin S. Z., Markham P. D., Wong-Staal F., Franchini G., Kalyanaraman V. S., Gallo R. C.* (1983). Restricted expression of human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) in transformed human umbilical cord blood lymphocytes, *Virology*, **129**, 51—64.
135. *Sarin P. S., Aoki T., Shibata A., Ohnishi Y., Aoyagi Y., Miyakoshi H., Emura I., Kalyanaraman V. S., Robert-Guroff M., Popovic M., Sarngadharan M., Nowell P. C., Gallo R. C.* (1983). High incidence of human type-C retrovirus (HTLV) in family members of a HTLV-positive Japanese T-cell leukemia patient, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 2370—2374.
136. *Sarngadharan M. G., Bruch L., Popovic M., Gallo R. C.* (1985). Immunological properties of the *gag* protein p24 of the AIDS virus (HTLV-III). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** (in press).
137. *Sarngadharan M. G., Popovic M., Bruch L., Schüpbach J., Gallo R. C.* (1984). Antibodies reactive with a human T lymphotropic retrovirus (HTLV-III) in the sera of patients with acquired immunodeficiency syndrome, *Science*, **224**, 506—508.
138. *Sarngadharan M. G., Robert-Guroff M., Gallo R. C.* (1978). DNA polymerase of normal and neoplastic mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **516**, 419—487.
139. *Saxinger W. A., Gallo R. C.* (1982). Possible risk to recipients of blood from donors carrying serum markers of human T-cell leukemia virus, *Lancet*, **1**, 1074.
140. *Saxinger W., Blattner W. A., Lavine P. H., Clark J., Biggar R., Hoh M., Moghissi J., Jacobs P., Wilson L., Jacobson R., Crookes R., Strong M., Ansari A. A., Dean A. G., Nkrumah F. K., Mourali N., Gallo R. C.* (1984). Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) antibodies in Africa, *Science*, **225**, 1473—1476.
141. *Saxon A., Stevens R. H., Golde D. W.* (1978). T lymphocyte variant of hairy cell leukemia, *Ann. Intern. Med.*, **88**, 323—326.
142. *Schüpbach J., Kalyanaraman V. S., Sarngadharan M. G., Blattner W. A., Gallo R. C.* (1983). Antibodies against three purified proteins of the human type-C retrovirus, human T-cell leukemia-lymphoma virus, in adult T-cell leukemia-lymphoma patients and healthy blacks from the Caribbean, *Cancer Res.*, **43**, 886—891.
143. *Schupbach J., Popovic M., Gilden R., Gonda M., Sarngadharan M. G., Gallo R. C.* (1984). Serological analysis of a subgroup of human T lymphotropic retroviruses (HTLV-III), associated with AIDS, *Science*, **224**, 503—505.
144. *Schüpbach J., Sarngadharan M. G., Gallo R. C.* (1984). Antigens on HTLV-infected cells recognized by leukemia and AIDS sera are related to HTLV viral glycoprotein, *Science*, **224**, 607—610.
145. *Seiki M., Hattori S., Yoshida M.* (1982). Human adult T-cell leukemia virus: molecular cloning of the provirus DNA and the unique terminal structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6899—6902.
146. *Seiki M., Hattori S., Hirayama Y., Yoshida M.* (1983). Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3618—3622.
147. *Shaw G. M., Gonda M. A., Flickinger G. H., Hahn B. H., Gallo R. C., Wong-Staal F.* (1984). Genomes of evolutionary divergent members of the human T-cell leukemia virus family (HTLV-I and HTLV-II) are highly conserved especially in pX, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4544—4548.



148. Shaw G. M., Hahn B. H., Arya S. K., Popovic M., Groopman J. E., Gallo R. C., Wong-Staal F. (1984). Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immunodeficiency syndrome, *Science*, **225**, 1473—1476.
149. Siegel F. P., Lopez C., Hammer G. S. et al. (1981). Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions, *N. Engl. J. Med.*, **305**, 1439—1444.
150. Sodroski J., Patarca R., Perkins D., Briggs D., Lee T. H., Essex M., Coligan J., Wong-Staal F., Gallo R. C., Haseltine W. A. (1984). Sequence of the envelope glycoprotein gene of type II human T lymphotropic virus, *Science*, **225**, 421—424.
151. Sodroski J. G., Rosen C. A., Haseltine W. A. (1984). Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells, *Science*, **225**, 381—385.
152. Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, **98**, 503—517.
153. Stahl R. E., Friedman-Kien A., Dubin R., Marmor M., Zolla-Pazner S. (1982). Immunologic abnormalities in homosexual men: relationship to Kaposi's sarcoma, *Am. J. Med.*, **73**, 171—178.
154. Stehelin D., Varmus H. E., Bishop J. M., Vogt P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA, *Nature*, **260**, 170—173.
155. Tajima K., Tominaga S., Kuroishi T., Shimizu H., Suchi T. (1979). Geographical features and epidemiological approach to endemic T-cell leukemia/lymphoma in Japan, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **9** (Suppl.), 495—504.
156. Tajima K., Tominaga S., Suchi T., Kawagoe T., Komoda H., Hinuma Y., Oda T., Fujita K. (1982). Epidemiological analysis on distribution of antibody to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen (ATLA): possible horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus, *Gann*, **73**, 893—901.
157. Takatsuki K., Uchiyama J., Sagawa K., Yodoi J. (1977). Adult T-cell leukemia in Japan. In: *Topics in Hematology*, ed. by S. Seno, F. Takaku, and S. Irino, pp. 73—77, Excerpta Medica, Amsterdam.
158. Takatsuki K., Uchiyama T., Ueshima Y., Hattori T. (1979). Adult T-cell leukemia: further clinical observations and cytogenetic and functional studies of leukemic cells, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **9**, 317—324.
159. Takatsuki K., Uchiyama T., Ueshima Y., Hattori T., Toibana T., Tsudo M., Wano Y., Yodoi J. (1982). Adult T-cell leukemia: proposal as a new disease and cytogenetic, phenotypic, and functional studies of leukemic cells, *Gann*, **28**, 13—22.
160. Taniguchi T., Matsui H., Fujita T., Takaoka C., Kashima N., Yoshimoto R., Hamuro J. (1983). Structure and expression of a cloned complementary DNA for human interleukin-2, *Nature*, **302**, 305—310.
161. Tosato G., Magrath I., Koski I., Dolley N., Blaese M. (1979). Activation of suppressor T-cells during Epstein-Barr virus induced infectious mononucleosis, *N. Engl. J. Med.*, **301**, 1133—1137.
162. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350—4353.
163. Trainin Z., Wernicke D., Ungar-Waron H., Essex M. (1983). Suppression of the humoral antibody response in natural retrovirus infections, *Science*, **220**, 858.
164. Uchiyama T., Broder S., Waldmann T. A. (1981). A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T-cells. 1. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac(+) cells, *J. Immunol.*, **126**, 1393—1397.

165. Uchiyama T., Broder S., Bonnard G. D., Waldmann T. (1980). Immunoregulatory functions of cultured human T-lymphocytes, *Trans. Assoc. Am. Physicians*, **93**, 251—262.
166. Uchiyama T., Yodoi J., Sagawa K., Takatsuki K., Uchino H. (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases, *Blood*, **50**, 481—492.
167. Vieira J., Frank E., Spira T. J., Landesman S. H. (1983). Acquired immune deficiency in Haitians: opportunistic infections in previously healthy Haitian immigrants, *N. Engl. J. Med.*, **308**, 125—129.
168. Vilmer E., Barré-Sinoussi F., Rouzioux C. et al. (1984). Isolation of a new lymphotropic retrovirus from two siblings with haemophilia B, one with AIDS, *Lancet*, **1**, 753—757.
169. Vyth-Drees F. A., de Vries J. E. (1983). Human T-cell leukemia virus in lymphocytes from a T-cell leukemia patient originating from Surinam, *Lancet*, **2**, 993.
170. Waldman T., Broder S., Greene W., Sarin P. S., Saxinger C., Blayney D. W., Blattner W. A., Goodman C., Frost K., Sharrow S., Depper J., Leonard W., Uchiyama T., Gallo R. C. (1983). A comparison of the function and phenotype of Sézary T-cells with human T-cell leukemia/lymphoma virus (HTLV)-associated adult T-cell leukemia, *Clin. Res.*, **31**, 5474—5480.
- 170a. Watanabe T., Seiki M., Yoshida M. (1983). Retrovirus terminology, *Science*, **222**, 1178.
171. Waterfield M. D., Scrace G. T., Whittle N., Stroobant P., Johnson A., Westerson A., Westernmark B., Heldin C-H., Huang J. S., Deuel T. F. (1983). Platelet derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p24 of simian sarcoma virus, *Nature*, **304**, 35—39.
172. Weijer K., Colofat J., Daams J. H., Hegeman P. C., Misdorp W. (1974). Feline malignant mammary tumors. II. Immunologic and electron microscopic investigations into a possible viral etiology, *JNCI*, **52**, 673.
173. Weissman I. C., McGrath M. S. (1982). Retrovirus lymphoma genesis: relationship of normal receptors to malignant cell proliferation, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **98**, 103.
174. Westin E. H., Wong-Staal F., Gelmann E. P., Dalla Favera R., Papas T. S., Lautenberger J. A., Eva A., Reddy E. P., Tronick S. R., Aaronson S. A., Gallo R. C. (1982). Expression of cellular homologues of retroviral *onc* genes in human hematopoietic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2490—2494.
175. Wong-Staal F., Gallo R. C. (1982). The transforming genes of primate and other retroviruses and their human homologues. In: *Viral Oncology*, Vol. I, ed. by G. Klein, pp. 153—171, Raven Press, New York.
176. Wong-Staal F., Hahn B., Manzari V., Colombini S., Franchini G., Gelmann E. P., Gallo R. C. (1983). A survey of human leukemias for sequences of a human retrovirus, HTLV. *Nature*, **302**, 626—628.
177. Yamada Y. (1983). Phenotypic and functional analysis of leukemic cells from 16 patients with adult T-cell leukemia/lymphoma, *Blood*, **61**, 192—199.
178. Yamamoto N., Okada M., Koyanagi Y., Kanagi M., Hinuma Y. (1982). Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T-cell leukemia virus, *Science*, **217**, 737—739.
179. Yoshida M., Miyoshi I., Hinuma Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2031—2035.

## Неканонические вирусы, вызывающие подострые спонгиозные энцефалопатии

*Д. Карлтон Гайдушек<sup>1</sup>*

Группа хронических прогрессирующих, неизбежно летальных инфекций центральной нервной системы (ЦНС) человека и животных вызывается необычными вирусами, обладающими очень странными физическими и биологическими свойствами, в связи с чем существует множество гипотез о природе этих, условно говоря, вирусов, которые часто называют просто агентами (табл. 33.1—33.3). Эти с трудом поддающиеся очистке вирусы нелегко увидеть; они чрезвычайно устойчивы к обычным физическим и химическим воздействиям, включая воздействие ультрафиолетом (УФ), ионизирующей радиацией, ультразвуком, нагреванием, нуклеазами и множеством антисептиков, таких, как формальдегид, глутаральдегид, хлороформ, эфир, спирт, фенол, иод, перекись водорода, соли четвертичных аммониевых оснований и оксид этилена. Высокая устойчивость к инаktivации и особенно необычный спектр инаktivирующего действия УФ-облучения, полное отсутствие антигенности частично очищенных высокоинфекционных ( $10^{12}$  ИД<sub>50</sub>/мл) препаратов и чрезвычайная устойчивость к ионизирующей радиации указывают либо на очень малый размер мишени, либо на очень сильную защиту благодаря агглютинации за счет агрегации гидрофобных инфекционных частиц. Эти наблюдения породили спекулятивные выводы о том, что впервые открыты микробы без нуклеиновой кислоты [1—3, 66, 106, 160] и без белков, отличных по антигенности от белков хозяина [66]. Естественно, что это привело к многочисленным противоречиям, которые лишь теперь близятся к разрешению [53, 147—151, 163, 166—170].

Эти «вирусы» (если мы принимаем этот термин для обозначения таких фильтрующихся реплицирующихся агентов, которые, возможно, способны запускать свой собственный синтез, используя клеточную генетическую информацию) вызывают два заболевания человека: куру и болезнь Крейтцфельда — Якоба (БКЯ) и их многочисленные клинические варианты, а также

---

<sup>1</sup> D. Carleton Gajdusek, Laboratory of Central Nervous System Studies, National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20205.



Таблица 33.1. Природные медленные вирусные инфекции, вызываемые неканоническими вирусами (подострые спонгиозные вирусные энцефалопатии)

**У человека**

Куру  
 Трансмиссибельные вирусные деменции  
 Болезнь Крейтцфельда—Якоба  
   Спорадическая  
   Семейная  
 Синдром Герстманна-Штраусслера  
   Спорадический  
   Семейный

**У животных**

Скрейпи  
   У овец  
   У коз  
 Энцефалопатия норок  
 Хроническое истощение  
   У домашних оленей  
   У домашних лосей

несколько заболеваний животных, включая болезнь скрейпи у овец и коз, инфекционную энцефалопатию (ЭН) домашних норок и хроническое истощение у одомашненных оленей и лосей (табл. 33.1). Они объединены в группу медленных вирусных инфекций [43, 74, 162] и называются подострыми спонгиозными вирусными энцефалопатиями [66, 89, 91].

Основной особенностью этих заболеваний является то, что их структурная и функциональная патология ограничена ЦНС; при этом другие органы не затрагиваются инфекцией, хотя при периферийном введении вирусы, прежде чем попасть в мозг, бессимптомно размножаются в ретикулоэндотелиальной системе [56, 98, 115]. Размножение идет очень медленно, без заметной латентной фазы, со временем удвоения примерно 5 дней; таким образом, для накопления вирусных частиц в высоком титре, при котором они вызывают функциональные нарушения и гибель клеток, требуются многие недели, а зачастую и месяцы [167]. На ранней стадии инфекции они вызывают слияние клеток и даже стимулируют amitotическое деление клеток [17, 125, 152], т. е. неудивительно, что они поражают и разрушают только нейроны (и, возможно, некоторые глиальные клетки), которые фиксированы своими отростками и не делятся.

Их культивируют *in vitro* в перевиваемых клеточных линиях [10, 79], однако вирионы не накапливаются в них в высоком титре, поскольку клетки делятся чаще, чем удваивается вирусный титр, и поэтому культуры самостерилизуются. Трансформация зараженных клеток из первичного мозгового эксплантата

Таблица 33.2. Атипические свойства неканонических вирусов

**Физические и химические свойства****Устойчивы к:**

- Формальдегиду и глутаральдегиду
- $\beta$ -Пропиолактону
- Этилендиаминттраацетату (ЭДТА)
- Нуклеазам (рибонуклеазе А и III, дезоксирибонуклеазе I)
- Соединениям *цис*-диаминоплатины
- Нагреванию (80 °C) (неполная инаktivация при 100 °C)
- Облучению ультрафиолетом (254 нм)
- Ионизирующей радиации ( $\gamma$ -лучи): эквивалентная мишень 150K; с коррекцией на полимерную ассоциацию:  $10^{11}$  Да
- Ультразвук

Атипичный спектр действия инаktivации ультрафиолетом: 237 нм =  $6 \times 254$  нм;  
220 нм =  $50 \times 254$  нм

Отсутствие морфологически различных вирионов при электронной микроскопии (сердцевинны или оболочки)

В зараженном мозгу наблюдаются амилоидоподобные фибриллы (ФСС: фибриллы, связанные со скрейпи), напоминающие агрегированный «белок, связанный со скрейпи» (белок «прions»)

**Биологические свойства**

Отсутствие эклипс-фазы

Время удвоения 5,2 дня (в мозгу хомячка); так же медленно в мозгу мышей

Длительный инкубационный период (от месяцев до нескольких лет; десятки лет)

Отсутствие воспалительных реакций

Хроническая прогрессирующая патология (медленная инфекция)

Отсутствие ремиссий и выздоровления: неизбежно летальная инфекция «Дегенеративная» гистопатология: амилоидные бляшки, глиоз

Отсутствие телец включения

Отсутствие продукции интерферона и интерференции с продукцией интерферона другими вирусами

Нечувствительность к интерферону

Отсутствие интерференции с вирусами ( $c > 30$  вирусами)

Отсутствие вирусной нуклеиновой кислоты, выявляемой по гибридизации и трансфекции

Отсутствие антигенности, отсутствие белков, отличных от белков хозяина

Отсутствие влияния на патогенез иммуносупрессии и иммуностимуляции, вызываемых следующими факторами:

АКТГ, кортизоном

Циклофосфамидом

Рентгеновским облучением

Противолимфоцитарной сывороткой

Тимэктомией и спленэктомией

Использованием «голых» мышей

Адьювантами

Интakтность В- и Т-клеточных функций как *in vivo*, так и *in vitro*

Отсутствие цитопатогенного действия на клетки *in vitro*

Переменная индивидуальная чувствительность к высокой дозе заражения у некоторых видов (например, при скрейпи у овец)

Различная чувствительность, вирулентность и патогенез (поражение различных зон мозга) у различных видов

Изменение круга хозяев при пассировании

Таблица 33.3. Классические вирусные свойства неканонических вирусов

---

Фильтруемость через поры диаметром 25 нм (скрейпи, ЭН); 100 нм (куру, БКЯ)

«Чистое» титрование на большинстве видов (все животные погибают при высокой дозе)

Репликация до титров  $10^5$ — $10^{11}$ /г в мозгу

Патогенез: сначала реплицируются в селезенке и других органах ретикуло-эндотелиальной системы, а затем в мозгу

«Адаптация» к новому хозяину (сокращение инкубационного периода)

Генетическая регуляция чувствительности у некоторых видов (у овец и мышей для скрейпи)

Специфический круг хозяев у каждого штамма

Наличие штаммов с различным кругом хозяев и вирулентностью

Возможность клональной селекции (при высоких разведениях) штаммов из «дикого вируса»

Интерференция медленно растущего штамма скрейпи с репликацией быстро растущего штамма у мышей

---

также ведет к самостерилизации из-за длительного периода удвоения этих вирусов [10, 167].

Они не вызывают иммунного ответа, и многие типы иммуносупрессии зараженных хозяев (вызванной, например, тотальным облучением организма, цитотоксическими препаратами, противолейкоцитарными сыворотками, АКТГ, кортизоном, спленэктомией и тимэктомией или характерной для бесшерстных мышей и лабораторных животных с другими Т-клеточными и В-клеточными дефектами) не приводят к значительным изменениям хода заболевания (табл. 33.2) [66, 113, 118, 143, 193].

В результате заражения происходит очаговая микровакуолизация в аксонах и дендритах нейронов, приводящая к заполнению перикариона, разбуханию нейрона и аксонов и к спонгиозному перерождению серого вещества. Наблюдаются также интенсивная пролиферация и гипертрофия астроглии. При этом отсутствуют воспалительные процессы, т. е. нет ни периваскулярного окружения лейкоцитами, ни лейкоцитарной инвазии паренхимы мозга [16—22, 121, 124—126, 195]. Болезнь протекает без лихорадки, в спинномозговой жидкости (СМЖ) не наблюдается плеоцитоза или возрастания уровня белка [80, 81, 171, 187, 195].

Ярко выраженная неспособность стимулировать иммунный ответ или воспалительную реакцию наряду с неспособностью индуцировать интерферон и нечувствительностью к его действию приобретают особо важное значение в связи с тем, что высокотитражные препараты ( $>10^{12}$  ИД<sub>50</sub>/мл) не индуцируют иммунный ответ в чувствительных хозяевах (морских свинках, хомячках, мышах, козах и птицах) при использовании схем иммунизации как с применением адъювантов, так и без них.



В лизосомных фракциях, полученных из тканей мозга больных, зараженных БКЯ или куру, или животных, зараженных скрейпи, но не из мозга здоровых, можно выделить фибриллы, связанные со скрейпи (ФСС) (рис. 33.1 и 33.2) [70, 147—151]. Эти фибриллы обнаруживаются также в препаратах низкомолекулярного белка, связанного со скрейпи и считающегося инфекционным; его частицы диаметром 10—20 нм и длиной 100 нм агрегируют, образуя фибриллы (рис. 33.2) [163]. ФСС напоминают также парные спиральные филаменты, которые обнаруживаются в нейрофибриллярных сплетениях, и амилоидные фибриллы; тем не менее они отличаются и от тех и от других (рис. 33.2) [70, 147, 151]. Как предполагают, ФСС представляют собой инфекционные частицы агента скрейпи в агрегированном состоянии [53, 70, 147, 148, 151, 163]. Подобно амилоиду, они окрашиваются конго красным и дают сходное двойное лучепреломление [163]. Поскольку аутоиммунные антитела к нормальным аксонным нейрофиламентам диаметром 10 нм, которые образуются у большинства больных БКЯ и куру [11, 13, 180—182] и у многих животных, экспериментально зараженных скрейпи, куру или БКЯ [8], реагируют как с нормальными аксонными нейрофиламентами, так и с нейрофибриллярными сплетениями [12, 45], содержащими парные спиральные филаменты, мы предположили, что нейрофиламенты и ФСС сходны: и те и другие дегенерируют с образованием парных спиральных филаментов (ПСФ) и нейрофибриллярных сплетений (НФС) и в конечном итоге амилоида и амилоидных бляшек, которые обнаружены в мозгу большинства больных куру и некоторых больных БКЯ, а также в мозгу некоторых животных, зараженных скрейпи [14, 70].

Столь необычные умозрительные рассуждения свидетельствуют о потрясении, которое вызвали эти неканонические вирусы в микробиологии. Уже давно считают, что они слишком малы ( $<100\text{K}$ ), чтобы содержать генетическую информацию для своего синтеза [90, 127, 130]. Широко распространено представление о том, что они служат дерепрессорами генетической информации хозяина для собственного синтеза [66, 72].

Наконец, по-видимому, существует структурная гомология между парными спиральными филаментами, входящими в НФС и ФСС, и амилоидными фибриллами, накапливающимися в мозгу, причем и те и другие могут иметь отношение к (10 нм)-нейрофиламентам [12, 107, 109]. Поскольку обнаружена гомология между амилоидом и иммуноглобулинами, полагают, что амилоидные иммуноглобулиноподобные молекулы (возможно, компоненты нейрофиламентов) вызывают в клетке синтез сходных молекул, несколько отличающихся от нормальных. Ключевым остается вопрос о том, содержит ли «вирус» нуклеиновую кислоту. Пока, несмотря на длительные поиски методами, основанными на

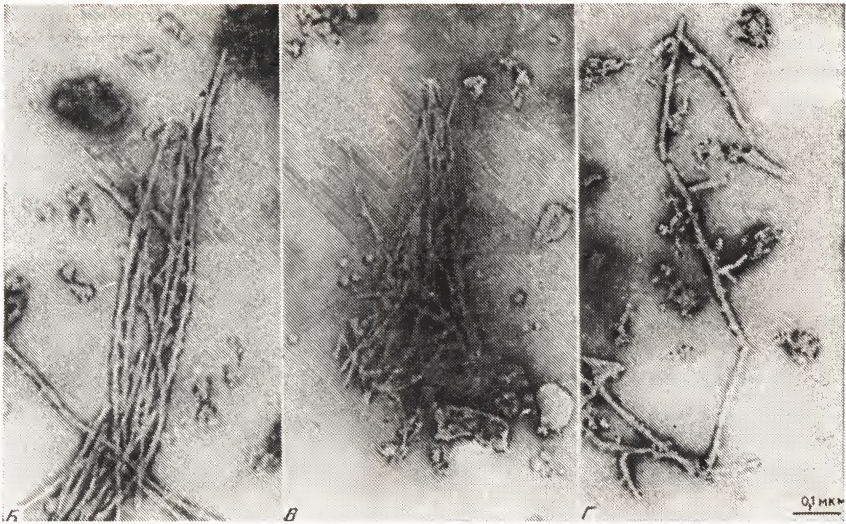


Рис. 33.1. А. Электронная микрофотография фибрилл, связанных со скрепией (ФСС), из мозга хомячков, зараженных скрепией. Негативное контрастирование фосфовольфрамом натрия;  $\times 66\,500$ . Справа: электронные микрофотографии парных спиральных филаментов (Б) и амилоидных фибрилл (В), полученных из материала больного сенильной деменцией типа Альцгеймера. Г. ФСС в мозгу больного с синдромом Герстманна — Штраусслера (вариант болезни Крейтцфельда — Якоба). Все препараты негативно контрастированы фосфовольфрамом натрия;  $\times 93\,100$ . (С любезного разрешения д-ра Патриции Мерц, Стейтен Айленд, Нью-Йорк.)

гомологии ДНК [26], трансфекции [27] и нуклеазной инактивации [105], ее идентифицировать не удалось.

Сторонники традиционной вирусологии более консервативны. Они по-прежнему считают, что гидрофобностью частиц агента скрепией [164], а также их необычной склонностью к агрегации [170] и ассоциации с плазматическими мембранами можно объяснить их свойства, не отказываясь от представления о вирусной природе агента, и лишь неточность методики определения инфекционности (возможен лишь тест *in vivo* на животных) мешает доказать это [166—170]. Очень малый размер, определенный в опытах по облучению [2, 90, 127], может оказаться ошибочным из-за агрегации [170], а полученные данные по инаktivации ненамного отличаются от общеизвестных в вирусологии крайних случаев, если рассматривать кинетику инаktivации чувствительного





вируса, а не резистентной агрегированной фракции [166—168, 170].

Необычным является то, что эта ситуация возникла на этапе интенсивного развития молекулярной биологии вирусов. Чрезвычайная сложность определения инфекционности, занимающего от 2 до 6 мес даже для наиболее «быстрых» штаммов возбудителей скрейпи (на хомячках) и БКЯ (на мышах), говорит сама за себя. Многие парадоксы, связанные с этими вирусами, вероятно, будут разрешены в течение ближайших нескольких лет.

Ниже обсуждаются отдельные заболевания, которые мы относим к подострым спонгиозным вирусным энцефалопатиям. Куру — первое из хронических подострых дегенеративных заболеваний человека, для которого доказана вирусная этиология. Оно привлекло внимание всего мира, что стимулировало поиск вирусов, подобных возбудителю куру и вызывающих другие подострые и хронические болезни человека [43, 57, 69, 74, 75, 80, 81, 97, 162, 194]. Такие медленно развивающиеся заболевания человека с многолетним инкубационным периодом и без воспалительного ответа на медленное разрушение клеток мозга ранее были неизвестны. В ветеринарии Сигурдссон [179] обнаружил подобные медленные инфекции у овец. Выяснение этиологии куру привело к обнаружению того, что пресенильные деменции типа БКЯ, обнаруживаемые по всему миру и характеризующиеся



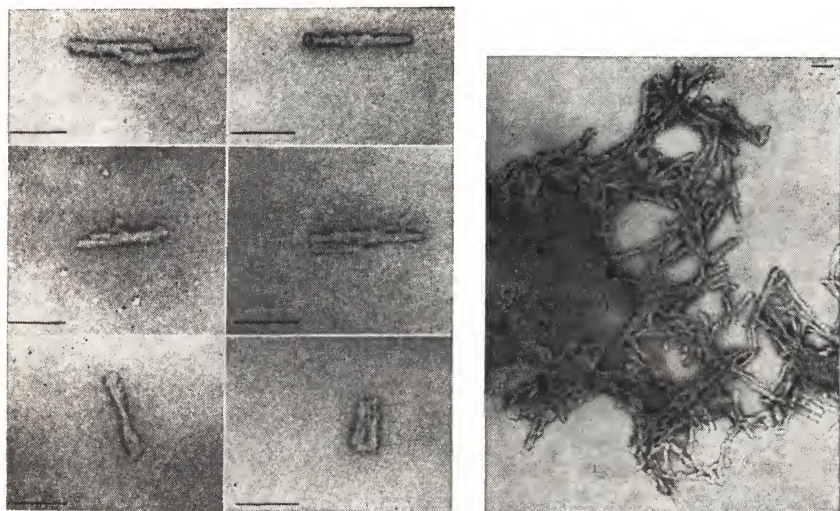


Рис. 33.2. Электронные микрофотографии высокоочищенной фракции скрейпи-специфического белка — «белка приона скрейпи» Прузинера и др. [163], — имеющего мол. массу 27—30К. Препараты негативно контрастированы уранил-формиатом. Масштабный отрезок соответствует 100 нм. Слева: «прионовые палочки» диаметром 10—20 нм и длиной 200 нм. Справа: скопления агрегированных «прионов», напоминающие амилоидные волокна. Как и амилоид, эти агрегаты окрашиваются конго красным и дают двойное лучепреломление. «Прионовые палочки» очень напоминают обнаруженные Мерц инфекционные фибриллы, связанные со скрейпи (рис. 33.1) [147—151]. (С любезного разрешения д-ра С. Прузинера, Сан-Франциско, Калифорния.)

такими же, как при куру, повреждениями на клеточном уровне, трансмиссибельны и вызываются похожими на возбудителя куру неканоническими вирусами [66, 67, 73, 89, 138].

Существуют другие медленные инфекции ЦНС человека, которые вызываются обычными вирусами, например вирусом кори, паповавирусами (JC и SV40—PML), вирусом краснухи, цитомегаловирусом, вирусом простого герпеса, аденовирусами типов 7 и 32 и вирусом клещевого энцефалита. Однако в отличие от этих «канонических» вирусов «неканонические» вирусы спонгиозных энцефалопатий очень медленно размножаются (имеют длительный период удвоения). К тому же именно они заставляют изменять наши представления о диапазоне существующих в природе вирусных структур.

### КУРУ

Куру характеризуется церебеллярной атаксией и тремором лихорадочного типа, которые прогрессируют до полного мотор-

ного расстройства с дисартрией и полной потерей речи. Заболевание оканчивается смертью менее чем через 1 год после его начала. Оно поражает жителей нескольких смежных долин в высокогорных районах Папуа — Новой Гвинеи и наблюдается в 169 деревнях с общим населением более 35 000 человек (рис. 33.3). На языке Форе куру означает дрожание или тряску. В культурно-лингвистической группе Форе, в которой наблюдается более 80% случаев куру, болезнь поражала примерно 1% популяции в год. Когда ее только начинали изучать, она была распространена среди людей всех возрастных групп, начиная с младенцев: мальчиков, девочек и взрослых женщин, но редко встречалась среди взрослых мужчин (рис. 33.4). Заметное преобладание смертей у взрослых женщин по сравнению с мужчинами привело в некоторых деревнях к отношению мужчин к женщинам более чем 3:1, а во всей группе Южного Форе (рис. 33.5) — к отношению 2:1 [6, 57, 61—64, 66, 67, 69, 80, 81, 92, 122, 129, 194].

Куру постепенно исчезала на протяжении последних 20 лет [4—6, 66, 67, 122]. За это время заболеваемость детей и молодых людей обоих полов снизилась и больше не регистрируется у лиц моложе 25 лет (рис. 33.6 и 33.7). Вероятно, это связано с прекращением практики ритуального каннибализма как составной части погребального обряда в знак уважения к покойному члену клана и связанным с ней заражением, в основном женщин и маленьких детей, через конъюнктиву, нос, кожу, слизистую и пищеварительный тракт высокоинфекционной тканью мозга [57, 64, 69, 92, 122, 129]. В недавних полевых исследованиях куру удалось получить четкое подтверждение того, что у человека инкубационный период болезни составляет 30 лет и более, и поскольку теперь больные куру редки, удалось выявить небольшие группы людей, каким-то образом связанных с больными, и установить конкретную жертву каннибальского пира как источник заражения [122]. Более 90% детей и женщин, участвовавших в акте каннибализма, уже заболело куру [122]. При продолжительном наблюдении никаких изменений в необычной картине исчезновения куру не выявлено. Это указывает на искусственную природу эпидемии: по-видимому, вирус куру не имеет естественного резервуара в природе и промежуточного хозяина; его единственный хозяин — человек. Кроме того, не существует трансплацентарной или неонатальной передачи от зараженной или уже больной матери ни в виде интегрированного генома, ни в виде фактора, передающегося при кормлении молоком. В 1982 г. было только 12 смертей от куру, причем возраст самых молодых жертв куру теперь >30 лет (рис. 33.6 и 33.7) [66, 69].



Рис. 33.3. А. Район куру (на карте показан черным цветом; области, находящиеся на высоте более 200 м, закрашены точками) населяют более 35 000 человек. Они живут в 169 деревнях (населенных пунктах), группирующихся вокруг покрытых джунглями гор на высоте от 1000 до 2500 м над уровнем моря. Б. Карта с бассейнами рек и деревнями, в которых когда-либо наблюдалось куру. Указаны культурно-лингвистические группы, к которым принадлежат деревни: А — Айана; АW — Ава; FN — Северное Форэ; FS — Южное Форэ; G — Гими, KE — Кейанга; KM — Камано; KN — Каните; U — Усуруфа; Y — Яте и YA — Ягария.

### Клиническая картина

Клиническое течение куру примечательно однотипно и характеризуется церебеллярными симптомами, которые прогрессируют вплоть до полной инвалидности и смерти обычно в течение 3—9 мес. Болезнь начинается внезапно, без предшествующего острого заболевания, и условно разделяется на три стадии: ходячую, сидячую и конечную. Некоторые больные сообщают о продромальных симптомах в виде головных болей и болей в руках и ногах. Лихорадка и судороги отсутствуют [6, 61, 63, 67, 80, 81, 194].

Обычно в первой, ходячей, стадии больной сам ставит себе диагноз — еще до того, как окружающие успевают заметить, что он болен. Наблюдается неустойчивость позы и походки и часто голоса, а также рук и глаз. Первые признаки — неустойчивость позы с ограниченным тремором, спотыкание и расстройство походки. Дисартрия начинается в ранней стадии, и с развитием болезни речь постепенно нарушается. Движения глаз атактичны, но настоящего нистагма не наблюдается. В ранней стадии заболевания часто появляется конвергентный стробизм, который





6

сохраняется и в последующем. Тремор напоминает вначале гиперчувствительность к холоду: наблюдается нерегулярная дрожь. Некоординированность движений начинается развиваться с ног и затем распространяется на руки. Больные в вертикальном положении часто топают ногами, как будто они злятся. При попытке сохранять равновесие в стоячем положении пальцы ног захватывают и скребут землю. В самом начале болезни хорошим диагностическим признаком является неспособность больного

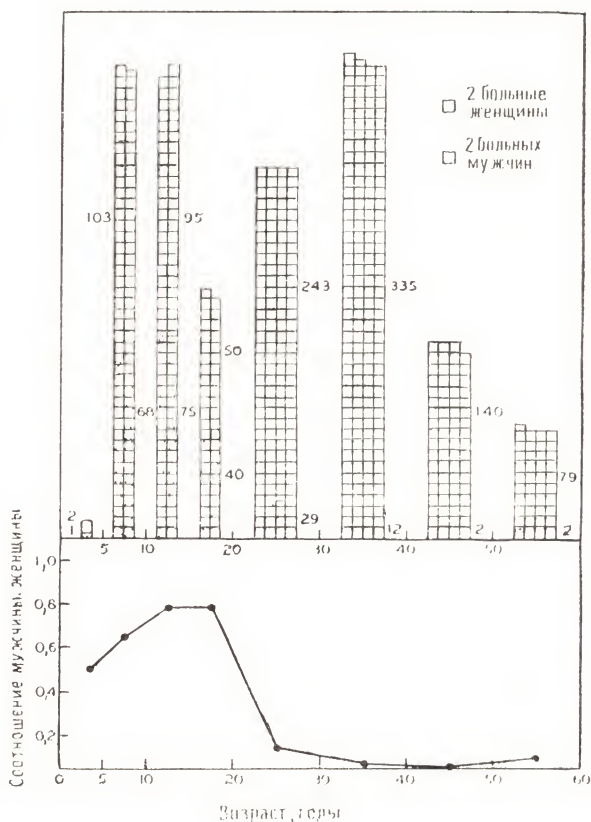
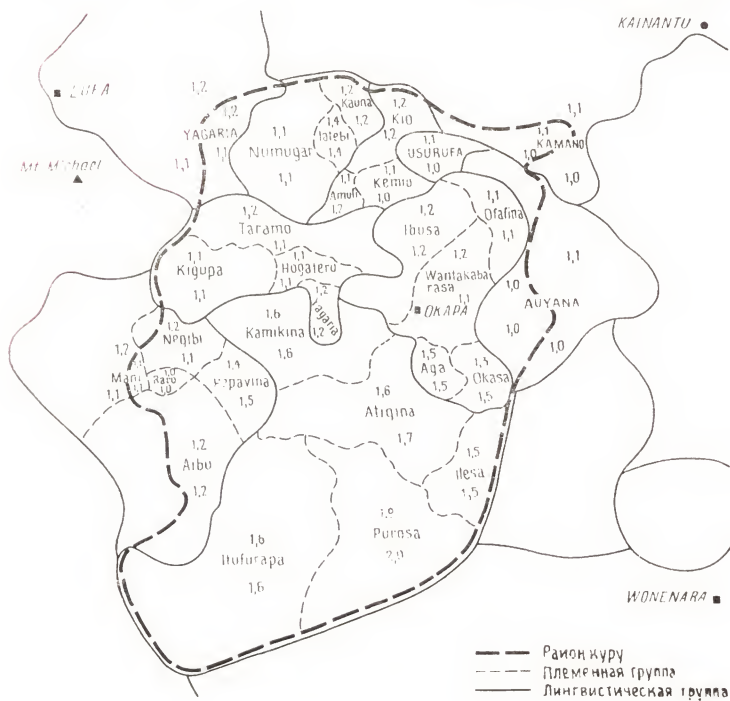
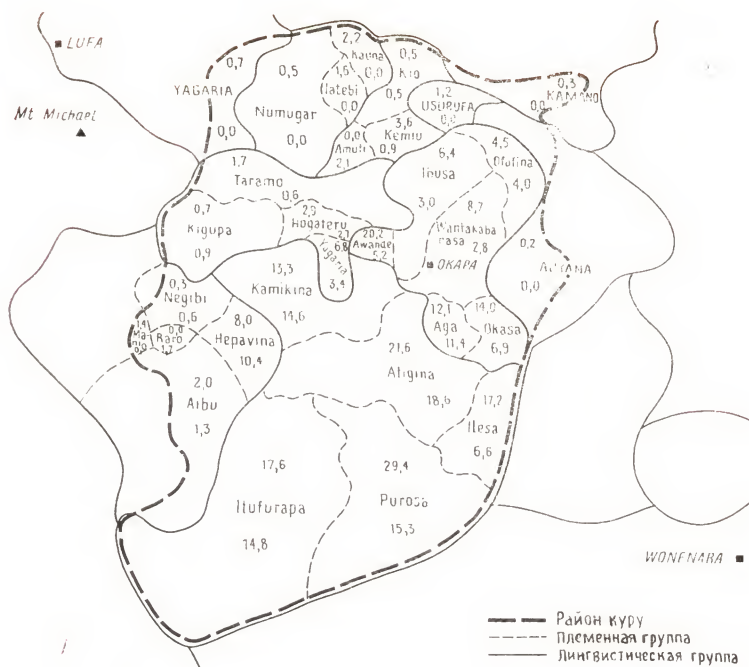


Рис. 33.4. Возрастное и половое распределение первых 1276 больных куру, обследованных на начальном этапе изучения куру. Самый молодой больной заболел в возрасте 4 лет и умер в 5 лет. В последние годы с исчезновением заболевания у молодых (никто из родившихся после прекращения каннибализма в данной деревне не умер от куру) возрастное и половое распределение полностью изменилось.

Рис. 33.5. Открытие куру совпало с пиком «эпидемии». *Вверху.* Смертность от куру выражена числом смертей на 1 тыс. человек в год в каждой племенной группе в районе встречаемости куру в 1957—1959 и 1961—1963 годах. Величины над каждым названием относятся к 1957—1959 гг., а под ним — к 1961—1963 гг. *Внизу.* Соотношение мужчин и женщин в каждой из племенных групп в районе куру в 1958 и 1962 гг. Два набора величин для периферических групп соответствуют этим соотношениям внутри и за пределами района куру. Величины над каждым названием относятся к 1958 г., а под ним — к 1962 г. В эти начальные годы исследования куру заболевание, поражающее преимущественно женщин, вызывало увеличивающееся нарушение соотношения полов.





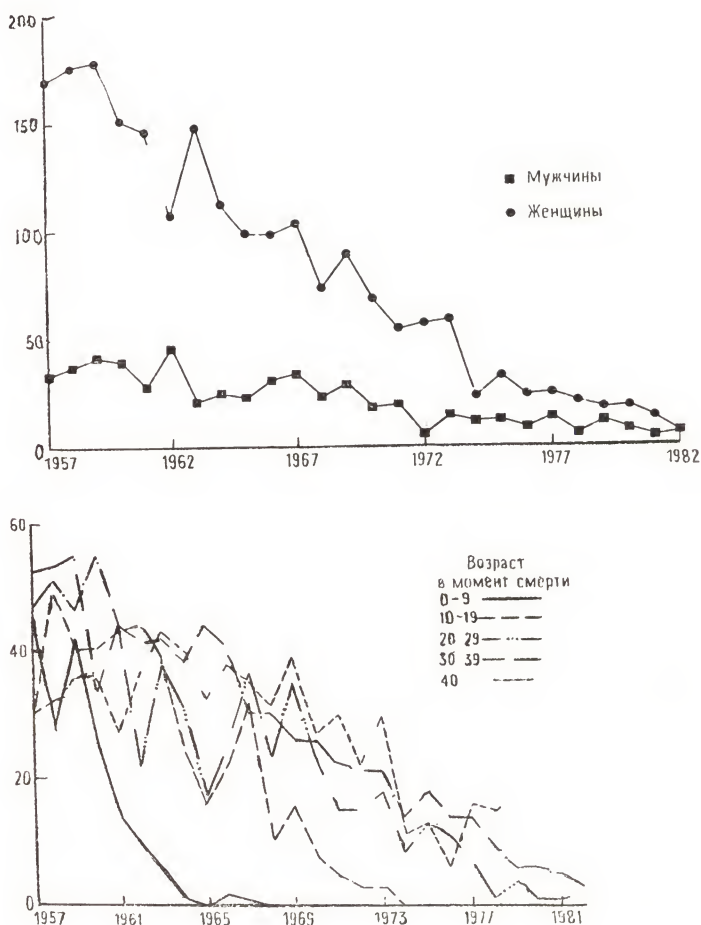


Рис. 33.6. *Вверху.* Суммарная смертность от куру у мужчин и женщин по годам, начиная с открытия куру в 1957 г. до 1982 г. За 26-летний период обследования от куру умерло более 2500 больных. При этом число больных медленно снижалось до одной десятой от величины, зарегистрированной в начале изучения. Заболеваемость у мужчин существенно снизилась только в последние несколько лет, в то время как у женщин она начала снижаться примерно на 10 лет раньше. Это снижение происходило по мере перехода от культуры каменного века, для которой характерен каннибальский траурный ритуал, к современному обществу с денежной экономикой, в котором население занимается разведением кофе. Поскольку ткани мозга, которые поедали совершающие обряд, содержали более 1 млн. инфекционных доз в 1 г, внедрение возбудителя через глаза, нос, кожу а также рот происходило каждый раз, когда съедали умершего от куру. Снижение заболеваемости началось после прекращения каннибализма в период с 1957 по 1962 г. в различных деревнях. *Внизу:* смертность от куру по возрастным группам с 1957 по 1982 г. Заболевание исчезло в самой младшей возрастной группе (0—9 лет) примерно на 10 лет раньше.

стоять на одной ноге в течение нескольких секунд. На первой стадии большинство больных продолжают работать в саду, выполняют свои обычные обязанности и принимают активное участие в общественной жизни деревни. В поздней фазе первой стадии, чтобы ходить по деревне без посторонней поддержки, они обычно используют палку (рис. 33.8).

Вторая, сидячая, стадия наступает тогда, когда больной уже не может ходить без поддержки. Тремор и атаксия становятся сильнее и переходят в ригидность рук и ног, связанную с обширным клонусом, или иногда в ударообразные подергивания мышц и грубые атетодные и хореодные движения, особенно когда больной дает преувеличенную реакцию на неожиданное изменение положения тела, а также при неожиданном звуке или вспышке света. Глубокие сухожильные рефлексы обычно нормальные; рефлекс Бабинского отрицательный. Обычно наблюдается клонус лодыжки, часто бывает коленный клонус. Хотя мышечная активность поддерживается плохо, фасцикуляции, реальной слабости мышц или атрофии не наблюдается. Характерна эмоциональная нестабильность, приводящая к взрывам патологического смеха, причем она иногда проявляется даже на начальной стадии болезни; улыбка и смех затухают медленно. Это дало повод для неудачных журналистских синонимов болезни. Большинство больных легко смиряются со своим положением и спокойно, на грани с эйфорией, относятся к своей болезни. Некоторые больные, особенно подростки и молодые мужчины, впадают в депрессию; иногда больные проявляют болезненную воинственность, когда их беспокоят члены семьи или окружающие. Обычно отмечают замедление умственной деятельности, однако глубокая деменция в явном виде отсутствует. Изменения чувствительности не наблюдается. Глазное дно без изменений.

На третьей, конечной, стадии больной неспособен сидеть без поддержки, а атаксия, тремор и дисартрия становятся более сильными, приводя к утрате трудоспособности. Сухожильные рефлексы могут усилиться. Появляется хватательный рефлекс, а некоторые больные обнаруживают характерные экстрапира-

---

ше, чем в группе 10—19-летних; в свою очередь в последней возрастной группе это заболевание исчезло на 10 лет раньше, чем в группе 20—29-летних. В настоящее время это заболевание почти полностью исчезло, и никто в возрасте до 25 лет не заболел куру за последние 5 лет. Число взрослых больных снизилось более чем до 1/10 величины, наблюдавшейся на раннем этапе наблюдений. Это изменение распределения заболеваемости куру может быть объяснено прекращением каннибализма в конце 1950-х гг. Ни один ребенок из рожденных после прекращения в данной деревне каннибализма не заболел куру.

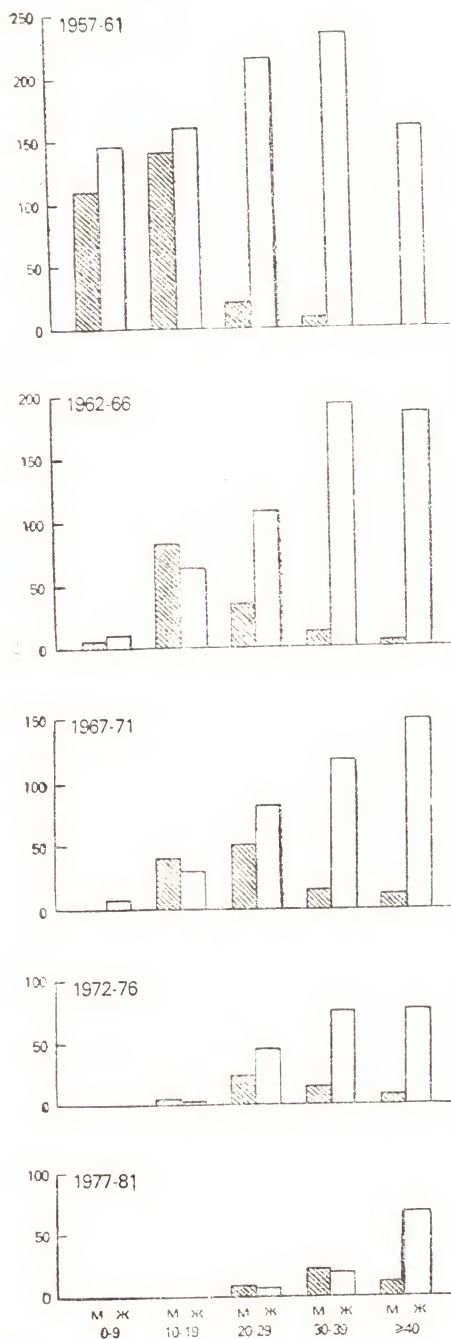


Рис. 33.7. Распределение смертей от куру по возрастам и полам в 1957—1981 гг. (периоды по 5 лет). Видно исчезновение заболевания сначала у 4—9-летних (заболеваний до 4 лет не наблюдалось) и затем у 10—19-летних. Никто моложе 25 лет не умер от куру начиная с 1978 г. Сейчас самому молодому среди живущих больных — 30 лет; м — мужчины, ж — женщины.

мидные нарушения позы и движений. Наконец, наступает неддержание мочи и кала, а дисфагия ведет к жажде и истощению от голода. Появляется вялость и развиваются признаки бульбарного процесса; больной перестает говорить и не реагирует на внешний мир. На этой стадии появляются глубокие пролежни, изъязвления, начинается гипостатическая пневмония, и больной погибает. К моменту гибели он обычно истощен, однако иногда, когда смерть наступает быстро, истощения не наблюдается.

### Морфологическая картина

За пределами ЦНС какой-либо патологии не наблюдается. Не отмечено также значительных повреждений мозга, за исключением атрофической церебеллярной дегенерации у многих больных. При куру широко распространены изменения в нервной системе, которые характеризуются заметной пролиферацией и гипертрофией астроцитов по всему мозгу, умеренным спонгиозным перерождением серого вещества, диффузной дегенерацией нейронов, которая наиболее выражена в мозжечке и его аффе-





Рис. 33.8. Две женщины, больные куру на такой стадии, когда они нуждаются в одной или двух палках для поддержки, но все еще способны выходить в поле на работу. Заболевание быстро прогрессирует, вплоть до смерти, в течение менее года с момента начала.

рентных и эфферентных пучках, и слабо выраженной демиелинизацией, которая, хотя и не очень отчетливо видна на срезах, окрашенных на миелин, может быть выявлена по наличию нейтрального жира. Кроме того, примерно в трех четвертях случаев

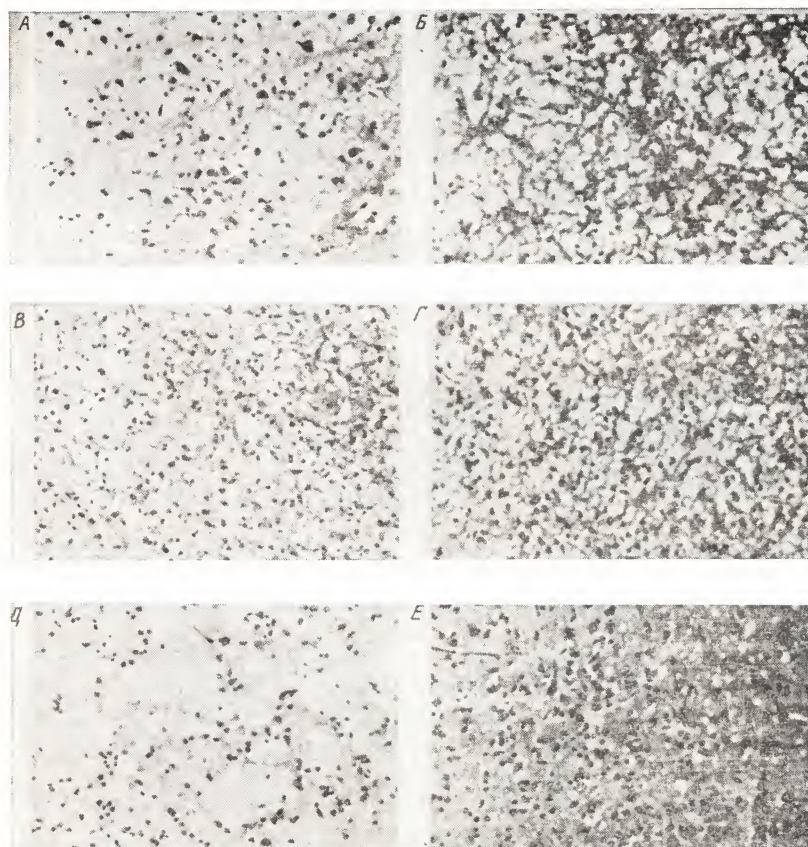
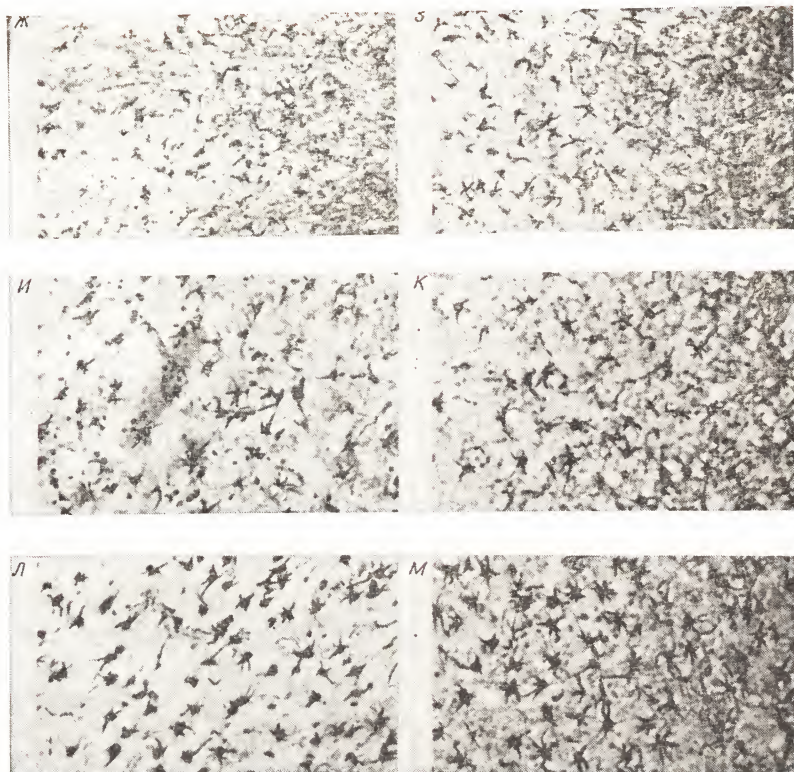


Рис. 33.9. А—Е. Сравнение спонгиозных изменений при скреппи у овец (А), куру у человека (В) и БКЯ у человека (Д) и соответственно при экспериментально полученных заболеваниях у мышей для скреппи (Б) и у шимпанзе для куру (Г) и БКЯ (Е). Окрашивание гематоксилином и эозином. Ж—М. Сравнение астроглиоза при скреппи у овец (Ж), куру у человека (И) и БКЯ у человека. (Л) и соответственно при экспериментальных заболеваниях у мышей для скреппи (З) и у шимпанзе при куру (К) и БКЯ (М). Окраска золотом по Казалу.

обнаруживаются содержащие амилоид и обладающие двойным лучепреломлением бляшки, которые окрашиваются при обработке реагентом Шиффа с надидной кислотой. В цитоплазме больших нейронов полосатого тела обычно образуются вакуоли. Спонгиозное перерождение является результатом не внутриклеточного отека, а скорее слияния вакуолей в пре- и постсинаптических отделах нейрона и в меньшей степени в астроцитах и олигодендроцитах (рис. 33.9) [16—20, 121, 124, 126].





В ультраструктурных исследованиях обнаружено слияние клеток, с утратой клеточной стенки между нейронами или между нейронами и соседними глиальными клетками, а также образование двудерных нейронов и нейронов с многодольными ядрами; в раннем инкубационном периоде у экспериментальных животных наблюдается амитотическое деление клеток [17, 121, 125, 152]. Вакуоль ограничивает аномальная плазматическая мембрана, состоящая более чем из трех слоев, характерных для нормальных плазматических мембран [18, 125].

#### Клинико-лабораторные наблюдения

В лабораторных исследованиях куру, так же как в исследованиях ее клиники и патологии, не удалось обнаружить классической картины инфекционного заболевания. Помимо того, что эта болезнь протекает без лихорадки (за исключением сопутствующей или терминальной инфекции), отсутствуют изменения в мазках периферической крови, отсутствует плеоцитоз, не по-



вышаются уровень белка в СМЖ и индекс реакции осадения эритроцитов (РОЭ). Все это не согласуется с представлением об инфекционном заболевании. Не наблюдается также изменений в почечной и печеночной функциях, а тесты на эндокринную систему остаются в норме [61, 63, 80, 81, 194].

### Эпидемиология

С самого начала исследования куру в 1956 г. и до настоящего времени обследовано в общей сложности более 2500 случаев. Все они закончились смертью в течение 2 лет, с несколькими исключениями, в которых была отмечена большая продолжительность заболевания. Смертность от куру непрерывно снижалась на протяжении последних 25 лет, и в настоящее время болезнь не встречается у детей, подростков и молодых взрослых. Когда исследования только начинались, ежегодно умирало более 200 больных, но теперь эта величина составляет 10—15 больных, все в возрасте  $>30$  лет. Тщательному осмотру подвергается все население во всех деревнях два раза в год (рис. 33.6 и 33.7) [4—6, 57, 69].

Эпидемиологические наблюдения не выявили заразности куру. Никто из приезжих не заболел после пребывания в районе распространения куру. Однако отмечены случаи заболевания среди лиц, длительное время отсутствовавших в этом районе, например уезжавших на учебу или работу. Эти лица всегда происходили из семей, в которых ранее регистрировалось куру. Не наблюдали случаев куру среди аборигенов в других районах Новой Гвинеи, питавшихся и проживавших совместно с лицами из района распространения куру, которые, пребывая вне этого района, находились в инкубационном периоде заболевания. Уже довольно давно, со времени установления административной власти примерно четверть столетия назад, в районе встречаемости куру проживают сотни аборигенов из других районов Новой Гвинеи и с окружающих Меланезийских островов и лиц европеоидной расы. Несмотря на многие тысячи человеко-лет тесного контакта этих иммигрантов с флорой, фауной, пищей и людьми в этом районе, среди них не отмечено ни одного случая куру. В периферийных районах с низкой заболеваемостью на севере и северо-западе района куру те немногие случаи, которые имели место, были представлены либо иммигрантами из районов с высокой заболеваемостью куру, либо их потомками, хотя эти лица составляют лишь небольшую часть населения в периферийных деревнях с низкой заболеваемостью.

Вскоре после открытия куру больных в самой ранней стадии болезни изолировали за пределы района куру и помещали на обычную больничную диету; несмотря на это, их болезнь про-

грессировала обычным путем и заканчивалась смертью. То же происходило с лицами, которые надолго покидали район куру и никогда более туда не возвращались.

Образ жизни населения в районе куру и в окружающих, свободных от куру районах сходен; соотношение женщин, детей и домашних животных, содержащихся в женских хижинах, у них одинаково. Основные домашние животные в горных районах Новой Гвинеи — свиньи, причем их содержание не имеет каких-либо особенностей в районе куру. Они не болеют никакими болезнями, не встречающимися за пределами этого района. Взрослые мужчины, которые составляют наименее подверженную заболеванию куру группу, питаются вместе с женщинами и детьми, т. е. рацион питания у них один и тот же. В районе Форэ не было каких-либо элементов, не встречающихся в том же количестве в соседних районах, где куру не встречается. Эндоканнибализм как обряд уважения к покойным не ограничен деревнями, в которых было распространено куру.

Механизм распространения куру, без сомнения, связан с ритуальным каннибальским обрядом, при котором папуасы употребляли в пищу внутренние органы умерших родственников в знак траура и уважения к ним. Они производили вскрытие трупов голыми руками и потом их не мыли, вытирали руки о тело и волосы, расчесывали раны и места укусов насекомых, вытирали глаза и носы детям и ели руками. Расчесывание зараженными ногтями зудящих чесоточных повреждений кожи и лишаев могло приводить к многочисленным внутрикожным и более глубоким инокуляциям [4—6, 57, 63, 64, 69, 92, 122, 129].

Растертые ткани мозга, которые они руками запихивали в бамбуковые цилиндры, имели инфекционность при разведении  $10^{-7}$  или выше. Эти ткани обладали инфекционностью даже при периферическом заражении и интрацеребральное их введение было не обязательно [72]. Путем скармливания мозга больных куру удалось заразить беличьих обезьян [86]. Прогревание тканей мозга и других внутренних органов на пару в бамбуковых трубках на высоте 6000—7500 фут (1830—2300 м) над уровнем моря соответствует их температуре не выше 95°С. Этого недостаточно для полной инактивации многих возбудителей, особенно таких термостабильных, как возбудитель куру. Женщины и дети, толпящиеся вокруг них или находящиеся у них на руках, подвергались большему риску заражения, чем мужчины, которые передоверяли проведение этого обряда женщинам. Мужчины редко ели мясо умерших жертв куру. Куру заражались все дети, которые находились в близком родстве с умершим от куру и матери которых принимали участие в каннибалистическом ритуале. Мальчик мог избежать заражения в том случае, если до того момента, когда он покидал женскую хижину и пе-

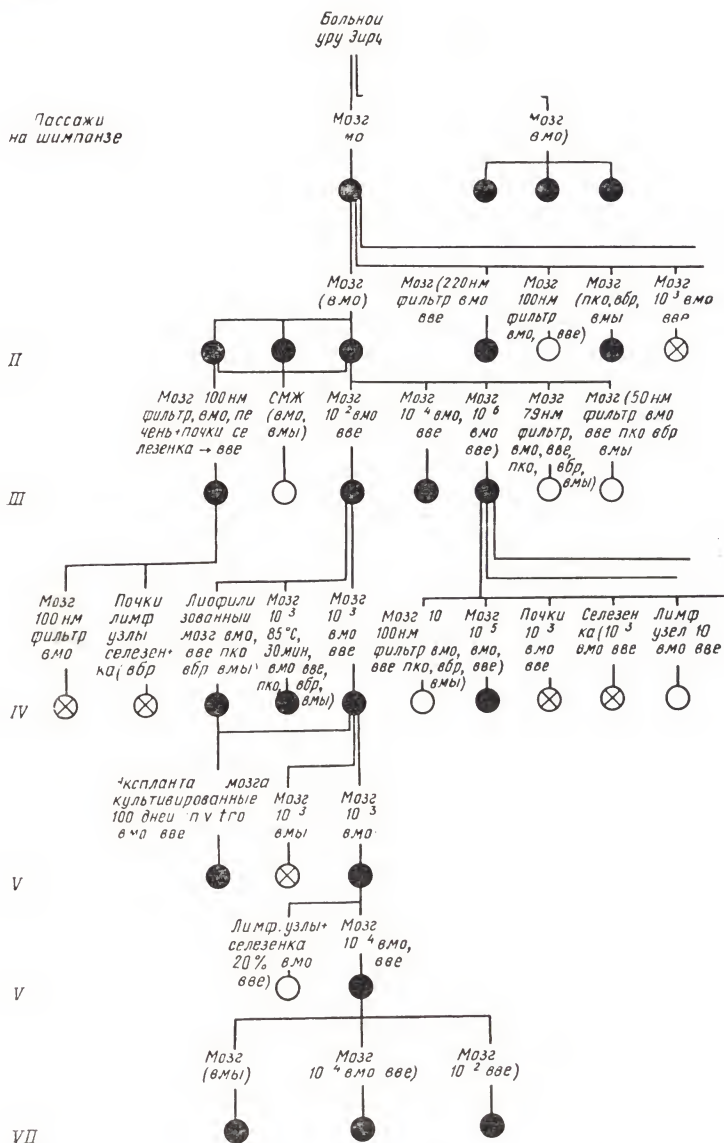
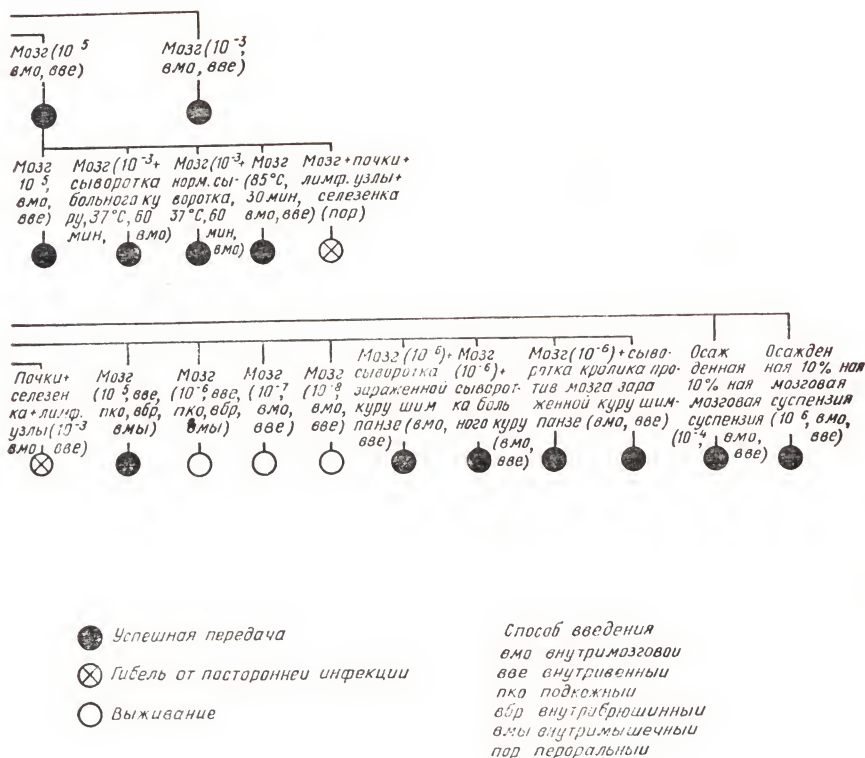


Рис. 33.10. Передача куру в опытах на шимпанзе, показывающая широкое использование на ранних этапах этого редкого и исчезающего вида и значительное сокращение использования шимпанзе после четвертого пассажа. К этому моменту мы обнаружили, что вместо шимпанзе можно использовать обезьян Нового Света, хотя у них инкубационные периоды гораздо более длительные. Как показано в опытах, агент не способен проходить через фильтры с диаметром пор 100 нм или меньше. Классическая реакция нейтрализации вируса (с использованием всего 10 инфекционных доз вируса) и сызороток от больных куру или шимпанзе, зараженных куру, или антисывороток, приготовленных им-





мунизацией кроликов и шимпанзе суспензией мозга больных кур, дает отрицательный результат. Вирус не обнаружен в почках, селезенке и лимфатических узлах. При интрацеребральном введении суспензия мозга шимпанзе имеет титр более  $10^{-6}$ , но при периферическом введении при разведении  $10^{-5}$  она не вызывает заболевания. На третьем пассаже (слева) суспензии печени, селезенки и почки при интрацеребральном введении вызывают заболевание, в то время как их фильтраты после пропускания через фильтры с диаметром пор 100 нм не вызывали его. Животное третьего пассажа, получившее материал того и другого типа, заболело.

реходил жить в мужскую, он не имел родственника, умершего от куру. Однако девочки не имели такой возможности [4—6, 57, 63, 69, 92, 122, 129].

### Этиология

Первоначально из-за высокой частоты встречаемости куру считалось эпидемическим инфекционным заболеванием [57, 64, 69]. Однако перечисленные ниже признаки заставили рассматривать его скорее как дегенеративный, а не инфекционный процесс. К этим признакам относятся отсутствие лихорадки или предшествующего острого заболевания, отсутствие плеоцитоза или повышения уровня белка в СМЖ, отсутствие изменений в абсолютном или дифференциальном показателе числа лейкоцитов или РОЭ периферической крови, отсутствие изменений в моче, полное отсутствие нейропатологических изменений, указывающих на воспаление, например периваскулярное вздутие, окружение мононуклеарными клетками или инфильтрация ими паренхимы мозга. Далее было отмечено также, что лицам, которые находились в течение многих лет в тесном контакте с

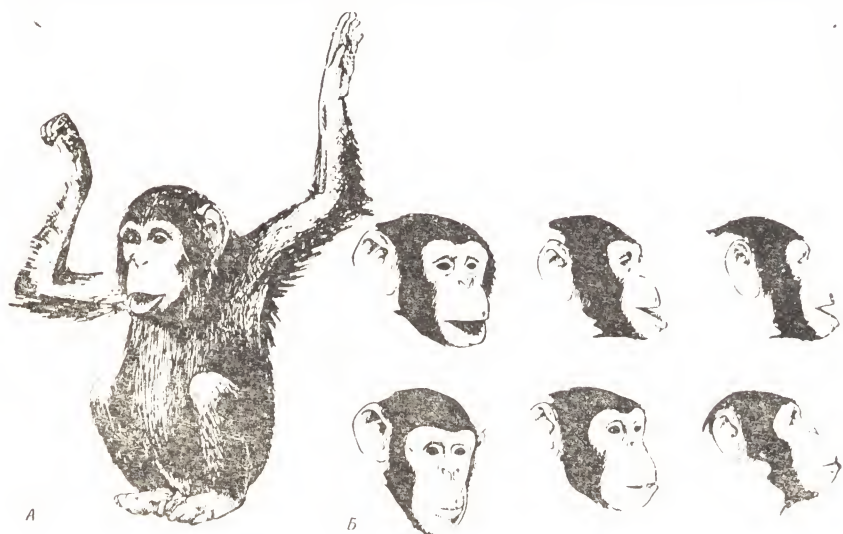


Рис. 33.11. А. Шимпанзе с отсутствующим выражением лица и отвисшей нижней губой — очень ранними признаками куру, предшествующими всем другим тяжелым неврологическим симптомам. У большей части животных этот признак появляется за много недель и даже месяцев до того, как становится заметным развитие других симптомов куру. Б. Вверху — лицо зараженной куру шимпанзе на трех последовательных этапах ранней стадии (срисовано с кинокадров). Внизу — лицо нормальной обезьяны.

Рис. 33.12. Шимпанзе на ранней стадии экспериментального куру ест с пола без захватывания пищи. Такой «пылесосный» тип питания является частым признаком заболевания у шимпанзе, когда уже заметны тремор и атаксия.



больными, длительное время живущими вне района куру (в качестве рабочих на плантациях или студентов), болезнь не передавалась, а прибывшие в район куру иммигранты не заболевали даже при тесном контакте с больными [80, 81, 194].

Чтобы объяснить все это, была предложена простая генетическая гипотеза: ген куру (К), доминантный у взрослых женщин и изредка пенетрантный у взрослых мужчин, в гомозиготном состоянии ответствен за появление куру у детей. Тогда гомозиготное состояние (КК) должно определять заболевание у детей обоих полов, а гетерозиготное (Кк) — появление болезни в течение взрослой жизни обычно у женщин, но реже (из-за пенетрантности) у мужчин. Данная гипотеза, однако, не объяснила, каким образом ген мог накопиться в столь необычно высокой концентрации при наличии высокой частоты утраты этого гена за счет смерти гетерозиготных лиц, еще находящихся в репродуктивном периоде. Никаких указаний на какие-либо компенсаторные преимущества в отношении репродуктивных способностей больных куру получено не было [61, 81].

Основываясь на сообщении Клатцо и сотр. [121], в 1959 г. Хэдлоу [97] указал на сходство в невропатологии скрейпи у овец и куру у человека. Это стимулировало интенсивное сравнительное изучение двух болезней и возобновление попыток заразить куру лабораторных животных [74]. В ходе этих попыток сначала животных содержали лишь несколько месяцев после заражения и лишь позже наблюдения стали планировать на несколько лет. В 1965 г. через 1,5 года после интрацеребрального заражения суспензией мозга больного куру заболевание удалось передать шимпанзе (рис. 33.10—33.13) [75, 76]. У них были отмечены те же признаки патологии, что и у жертв куру [16]. Заболевание можно было серийно передавать от шимпанзе к шимпанзе, ис-





Рис. 33.13. Пределы движения передних конечностей при ходьбе. Слева. Картина, характерная для шимпанзе в норме. Справа — для шимпанзе на 2-й стадии экспериментального куру. Количественная оценка была проведена при изучении отдельных кадров кинофильма.

пользуя суспензии мозга или других внутренних органов больных животных; суспензии вводили либо интрацеребрально, либо периферически (внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно) [76]. После интрацеребрального введения инкубационный период у шимпанзе варьирует от 14 до 39 мес. При втором пассаже он снижается до 10—12 мес и остается таким при последующих пассажах (рис. 33.10) [72].

В течение нескольких лет вся работа с куру проводилась на шимпанзе — первом виде животных, которому удалось передать куру [66, 67, 73, 75, 76]. Оказалось, что к куру восприимчивы и другие виды приматов, а именно несколько видов обезьян Нового Света: паукообразная обезьяна (*Ateles* sp.), беличья обезьяна (*Saimiri* sp.), капуцин (*Cebus* sp.) и шерстистая обезьяна (*Lagothrix* sp.) — с более длительным инкубационным периодом, чем у шимпанзе [71, 72, 88], и несколько видов обезьян Старого Света с еще более длительным инкубационным периодом [88]. При первичном заражении тканями мозга либо от больных людей, либо от шимпанзе, инкубационный период у обезьян Нового Света обычно составляет 2 года и больше, но при серийных пассажах на капуцинах он снижался до  $<1$  года (рис. 33.14) [71, 72]. У обезьян Старого Света инкубационный период может быть намного длиннее. Нам удалось заразить куру норок и хорьков — первых неприматов, которые оказались восприимчи-

выми к куру. Вместе с тем около десятка других видов лабораторных, домашних и диких животных (неприматов), а также птиц оказались невосприимчивыми (наблюдения за ними велись в течение многих лет). Мы также передали куру козам, используя суспензию мозга как человека, так и экспериментально зараженных обезьян. У коз заболевание напоминает скрейпи. Овцам передать куру не удалось [88].

Вирус регулярно выделяли из тканей мозга больных куру. У обезьян инкубационный период при интрацеребральном введении варьирует от 1 до 12 лет. Вирусный титр может достигать большой величины ( $>10^8$  ИД<sub>50</sub>/г ткани мозга больных или экспериментально зараженных животных). В периферических тканях человека или животных, в частности в печени и селезенке, вирус обнаруживается только иногда после смерти в namного меньших титрах. Кровь, моча, слюна, лейкоциты, СМЖ, молоко, плацента и оболочки плода больных куру или животных с экспериментальным куру не содержат вируса (рис. 33.10) [67, 72].

За время, прошедшее после первых заражений, были проведены многочисленные вирусологические исследования с трансмиссильным возбудителем куру. Куру вызывается вирусом, фильтрующимся через мембраны с максимальным размером пор 220 нм. Возбудитель устойчив при хранении при  $-70^{\circ}\text{C}$  или в лиофилизованном состоянии в течение многих лет. Он не инактивируется при длительной обработке при температуре  $80^{\circ}\text{C}$  и частично сохраняет инфекционность при прогревании в течение 30 мин при  $100^{\circ}\text{C}$ . Как и возбудитель скрейпи, он высокоустойчив к УФ, ионизирующей радиации и обработке ультразвуком. К обработке формальдегидом и другими вирулицидными веществами он устойчив в той же степени, что и агент, вызывающий скрейпи. Как и в случае скрейпи, суспензии мозга больных куру вызывают слияние клеток, а их лизосомные фракции мозга содержат ФСС [70, 147, 148].

Никаких серологических тестов на вирус разработать не удалось. Многочисленные попытки обнаружить нейтрализующие, преципитирующие или комплементсвязывающие антитела с использованием суспензий тканей с высоким титром инфекционности в качестве антигена оказались безрезультатными; кроме того, испытания сывороток больных куру людей и животных с экспериментальным куру, а также кроликов, иммунизированных тканями мозга больных куру людей и животных в качестве потенциальной антисыворотки, дали отрицательный результат. В ходе заболевания у 60% больных и у многих экспериментально зараженных обезьян возникают аутоиммунные антитела против (10нм)-нейрофиламентов аксона [8, 13, 180, 181].

Вирус сохраняется *in vitro* в тканях эксплантированных кусочков мозга шимпанзе, экспериментально зараженных куру, в

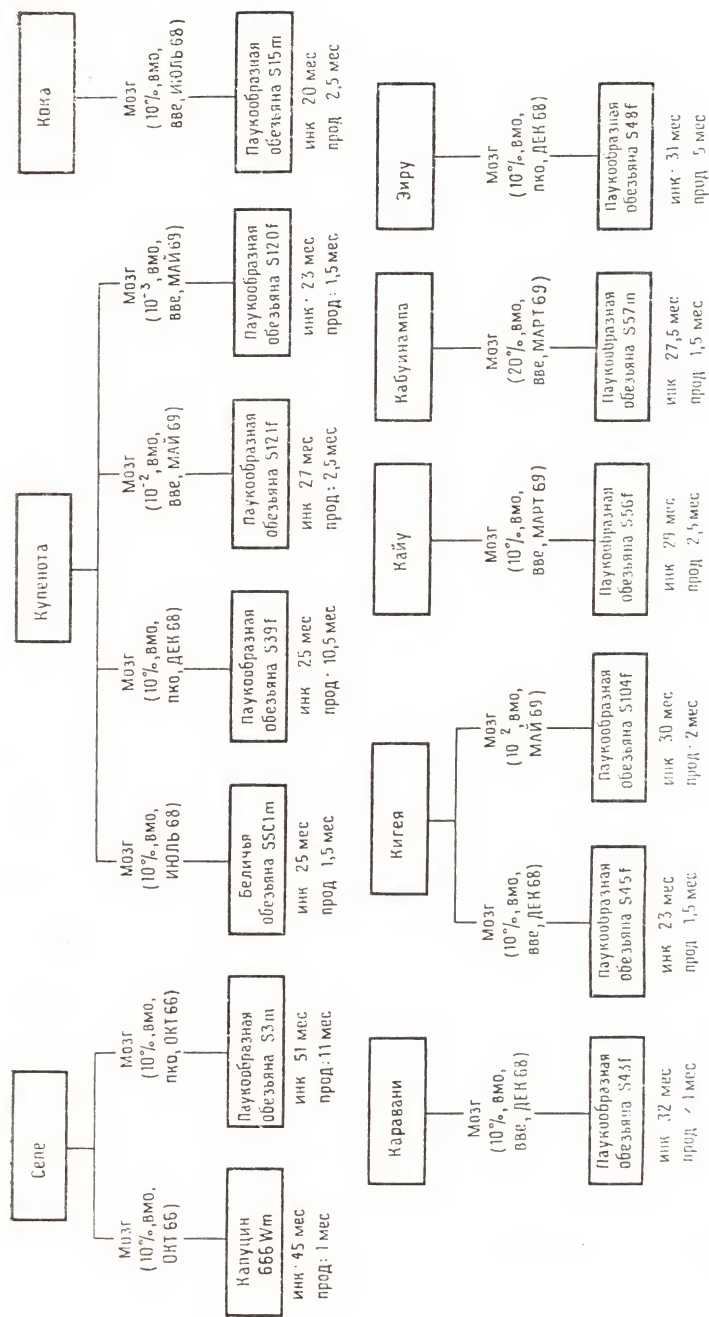


Рис. 33.14. Первичная передача вируса куру от 8 больных 13 обезьянам Нового Света; инк—инкубационный период, прод— продолжительность болезни.



течение многих месяцев с повторным субкультивированием (или без него), причем культивированный таким образом вирус не утрачивает своей вирулентности для шимпанзе. Однако трансформация зараженных клеток SV40 ведет к утрате инфекционности куру. Это, очевидно, происходит из-за того, что трансформированные клетки удваиваются быстрее, чем вирус [10, 79].

## ВИРУСНАЯ ДЕМЕНЦИЯ (БОЛЕЗНЬ КРЕЙЦФЕЛЬДТА—ЯКОБА)

### Клиническая картина

Болезнь Крейцфельдта — Якоба (БКЯ) — это редкая, обычно спорадически встречающаяся пресенильная деменция, обнаруживаемая по всему миру (рис. 33.17). Вместе с тем примерно в 10% случаев она имеет семейный характер наследования. Типичная клиническая картина включает быстро прогрессирующую общую деменцию, миоклонус, заметные прогрессивные нарушения моторных функций, а также пароксизмальные вспышки высоковольтных медленных волн на электроэнцефалограмме (ЭЭГ). Заболевание обычно имеет летальный исход менее чем через 1 год после начала [34, 66, 91, 120, 171—173, 187] (рис. 33.15 и 33.16).

### Передача

Болезнь Крейцфельдта — Якоба можно регулярно передавать шимпанзе [67, 73, 89], обезьянам Нового и Старого Света [66, 71, 72]; некоторыми, но не всеми штаммами возбудителя можно заражать домашних кошек [66, 88, 95, 152], морских свинок [131, 133], сирийских хомячков [132] и лабораторных мышей [183, 184]. У этих животных патология на клеточном уровне неотличима от природного заболевания и экспериментального куру. Инокуля-

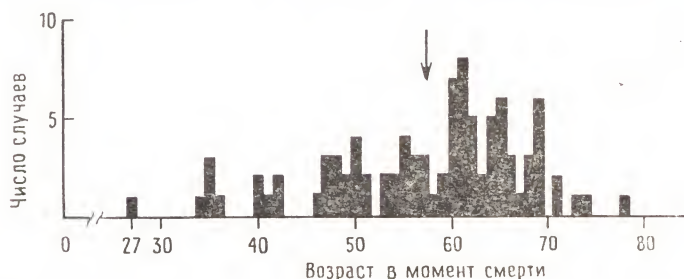


Рис. 33.15. Распределение по возрастам смертей 94 больных БКЯ. Средний возраст к моменту смерти составляет 57 лет (показано стрелкой).

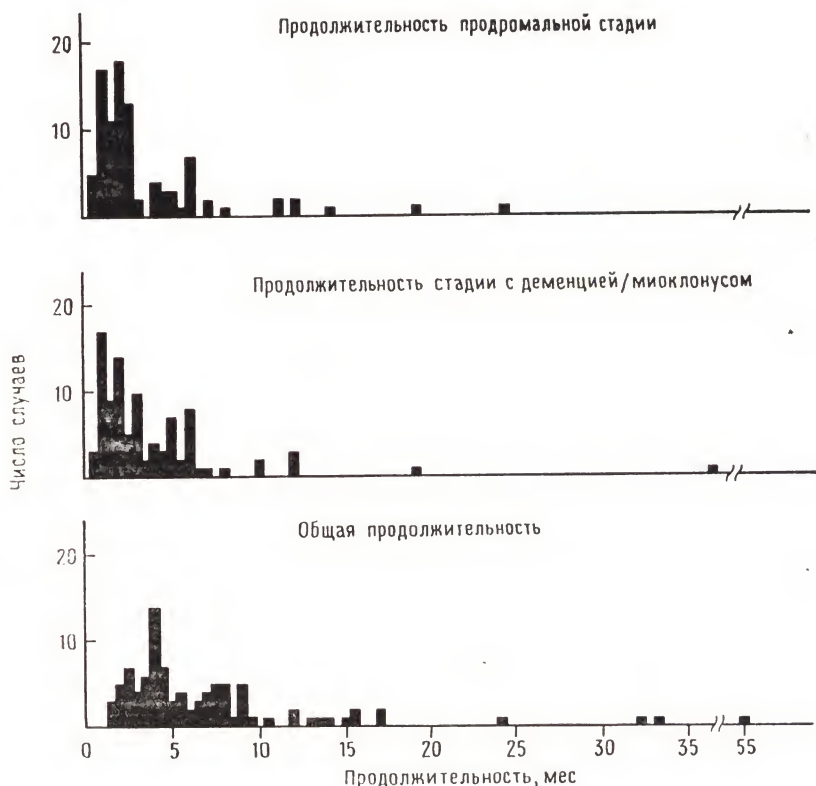


Рис. 33.16. Длительность болезни у 94 больных БКЯ. Средняя длительность продромальной стадии составляет 3,5 мес (стандартное отклонение (SD) 3,9; разброс от 0,5 до 24,0), средняя длительность стадии с деменцией/миоклонусом — 3,9 мес (SD=4,6; разброс от 0,5 до 36,0), и средняя общая длительность — 7,3 мес (SD=7,5; разброс от 1,5 до 55,0).

ция тканей мозга козам в высоком разведении дает заболевание, неотличимое от скреппи. Этого не происходит при инокуляции овцам [88]. Поскольку инкубационные периоды и круг хозяев у разных изолятов различаются, в настоящее время в лабораториях существует множество штаммов вируса БКЯ. Штаммы со сходными свойствами могут помочь в выявлении случаев заражения от общего источника [88].

Поскольку теперь, так же как и для скреппи, имеется мышиная модель БКЯ [183], удалось провести обширные работы по исследованию патогенеза экспериментальной инфекции. Был выявлен генетический контроль инкубационного периода и распределения поражений [117, 119], а также персистентная вире-



Рис. 33.17. Повсеместное распространение БКЯ. Заштрихованы страны, в которых имеются сведения о БКЯ. Из некоторых стран, таких, как Мадагаскар, Алжир, Ливия, Тунис, Индонезия, Китай и восточные районы СССР, в нашу лабораторию поступали сообщения о заболеваниях, которые не были опубликованы. Смертность составляет 1/1 000 000; при повышенном внимании к этому заболеванию эта величина возрастает. В очагах с высокой заболеваемостью [например, в Словакии, Чили и Израиле (ливийские евреи)] смертность значительно выше.



мия и преимущественная репликация вируса в лимфоцитах низкой плотности [123]. Благодаря использованию штаммов, адаптированных к мышам, было четко показано, что вирус БКЯ так же устойчив ко многим физическим и химическим агентам, как агент скрепли [116].

### Спектр клинических синдромов вирусной деменции

Во время изучения круга заболеваний, вызываемых вирусом БКЯ, было показано, что разнообразные клинические синдромы, включающие деменции в течение среднего и позднего периода жизни, представляют собой медленные вирусные инфекции, сопровождающиеся вакуолизацией нейронов, спонгиозным состоянием серого вещества и астроглиозом [34, 70, 72, 91, 120, 139, 171—173, 187]. Больным с БКЯ, подтвержденной выделением вируса, одновременно (и впоследствии при аутопсии) были поставлены следующие диагнозы: опухоль мозга (глиобластома, менингиома), отек мозга, болезнь Альцгеймера, прогрессивный супрануклеарный паралич, сенильная деменция, удар, синдром Кельмайера — Дего [138]. На практике очень важно выявить спектр подострых и хронических неврологических заболеваний, которые вызываются этим или связанным с этим вирусом. Поскольку в 14% случаев выявляются амилоидные бляшки, характерные для куру, а во многих других, в дополнение к спонгиозному перерождению серого вещества и астроглиозу, обнаруживаются изменения, типичные для болезни Альцгеймера, и поскольку иногда наряду с БКЯ проявляются также и иные неврологические расстройства, мы решили обозначать эти нарушения термином «трансмиссивные вирусные деменции» (ТВД) [34, 37, 136, 137].

### Эпидемиология

После первой успешной передачи БКЯ [89] мы получили более 500 препаратов биопсий или раннего посмертного материала тканей мозга при патоморфологически подтвержденной БКЯ; вирус удалось передать приматам при введении 218 из этих препаратов. У нас имеются клинические данные о более чем 1000 случаях. Распространенность БКЯ сильно варьирует по времени и месту в США и Европе; мы заметили тенденцию к более частой постановке диагноза БКЯ в ряде клиник, где внимание к этому заболеванию было привлечено опытами по передаче синдрома приматам и случайным заражением в ходе хирургических операций. Во многих больших городах США, Европы, Австралии и Азии распространенность приближалась к

одному случаю на 1 млн. человек; ежегодная заболеваемость и смертность имели эту же величину, поскольку длительность болезни варьирует от 8 до 12 мес [138] (рис. 33.16). В последние годы заболеваемость, составляющая по крайней мере один случай на 1 млн. человек в год, характерна для Австралии, Франции [31, 32, 39], Швейцарии, Англии [140, 189], Швеции, Финляндии, Израиля [111, 156], Чили [82], Японии, США и многих других стран. Мы обратили внимание на иногда встречающееся сближение во времени и пространстве случаев несемейных заболеваний в небольших населенных пунктах в Израиле [111, 156], Чехословакии [141, 142], Венгрии [141], Англии [140, 189], Чили [82] и США [138]. Такое географическое и временное группирование относится, однако, к меньшей части случаев; его нельзя объяснить теми 10% случаев, которые имеют семейный характер. Известны два сообщения о семейном заболевании, когда муж и жена умерли от БКЯ с промежутком в несколько лет [110]. По данным Каханы и др. [111], в Израиле ежегодная заболеваемость варьирует от 0,4 до 1,9 случая на 1 млн. человек для различных этнических групп. Эти авторы отмечают, однако, что заболеваемость среди евреев ливийского происхождения примерно в 30 раз превышает заболеваемость среди евреев европейского происхождения; другие исследователи связывают это превышение с семейным группированием [156].

Передача от человека к человеку была зафиксирована у реципиента, получившего роговицу при пересадке от донора, которому ретроспективно был поставлен диагноз БКЯ. Заболевание наступило через 18 мес после трансплантации, что хорошо соответствует среднему инкубационному периоду при заражении шимпанзе тканями мозга людей, больных БКЯ [55]. Из суспензии мозга больного, погибшего от БКЯ после пересадки роговицы, нам удалось передать заболевание шимпанзе, несмотря на то что мозг в течение 7 мес находился в 10%-ном формальдегиде [78]. В нескольких случаях подтвержденного диагноза ТВД больные были профессиональными донорами крови вплоть до появления первых симптомов. До настоящего времени, однако, не удалось осуществить передачу ТВД переливанием крови. Мы перелили шимпанзе кровь больных БКЯ людей в количестве 300 мл, и несмотря на это, они остаются здоровыми уже 6 лет. Наконец, в связи с обнаружением БКЯ у нейрохирурга, двух врачей, дантиста и двух его пациентов [189] встал вопрос о возможном врачебном заражении, особенно в тех случаях, когда врач соприкасается с зараженными тканями больного в ходе хирургической операции или на вскрытии.

Впервые Невин и др. [157], а затем и другие исследователи [58, 138, 140, 189] отметили необычно высокую частоту БКЯ у больных, перенесших ранее краниотомию. Этот факт указы-

вает на то, что краниотомия либо открывает входные ворота для заражения, либо запускает патологический процесс у больных, находящихся в латентной стадии. Первую возможность подтверждает передача БКЯ двум молодым эпилептикам, которым вживили серебряные электроды, стерилизованные 70%-ным этанолом и парами формальдегида после того, как эти электроды использовали для больного БКЯ [23]. Этим двум больным вживляли электроды для стереотактической локализации очагов эпилепсии во время корректирующей операции. Когда эти же электроды, стерилизованные парами формальдегида, были еще раз имплантированы шимпанзе, у нее развилась БКЯ [66].

Спорадическая болезнь Альцгеймера не передается приматам. Этот вывод был сделан в опыте с более 30 образцами тканей мозга больных несемейной формой болезни Альцгеймера. Когда эти образцы инокулировали приматам, чувствительным к ТВД, они не заболели. Однако некоторые длительно текущие случаи БКЯ невозможно отличить от болезни Альцгеймера без невропатологического исследования [34]. Передачу спонгиозных энцефалопатий шимпанзе от двух больных семейной формой болезни Альцгеймера не удалось воспроизвести в последующих экспериментах, а многочисленные попытки передать эту форму болезни оказались отрицательными [37, 39].

### **Проявление семейной формы БКЯ детерминируется одним аутосомным доминантным геном**

Как удалось показать, несмотря на то что БКЯ вызывается вирусом, при семейной форме этой болезни реализуется картина работы одного аутосомного гена [136]. БКЯ стала первым инфекционным заболеванием, для которого доказан контроль чувствительности и заболеваемости одним геном. Аутосомное доминантное поведение болезни в семьях, включая проявление болезни в 50% sibсов, доживших до возраста, в котором проявляется болезнь, показало возможность участия медленных вирусных инфекций и в других семейных деменциях. Наличие больных БКЯ в семьях с хорошо установленной болезнью Альцгеймера и семейное заболевание цереброспинальной атактической формой БКЯ (синдром Герстманна — Штраусслера), которая также трансмиссильна, привели к возрождению интереса к семейным деменциям всех типов [9, 136, 137, 187].

### **Аутоиммунный ответ на (10нм)-нейрофиламенты**

Обнаружение у более 60% больных куру и БКЯ очень специфичных аутоиммунных антител исключительно против (10нм)-нейрофиламентов — как феномена, проявляющегося в



поздней стадии болезни, было первым указанием на иммунные процессы, происходящие при подострых спонгиозных энцефалопатиях [180, 181]. Благодаря этому обнаружению начало развиваться новое перспективное направление в исследовании этих заболеваний. Сходство выявленных аутоиммунных антител со многими другими аутоиммунными антителами (например, с ревматоидным фактором или антителами анти-ДНК при системной красной волчанке и с противотироглобулиновыми антителами при тиреоидите Хашимото) заключается в том, что и те и другие иногда встречаются у нормальных индивидуумов, причем чаще у близких родственников больных. Хотя эти антитела обнаруживаются у примерно половины всех больных ТВД, у больных классической формой БКЯ они встречаются реже, чем в 40% случаев. Они появляются и при других заболеваниях серого вещества, в том числе при болезнях Альцгеймера и Паркинсона, но с гораздо меньшей частотой, чем при БКЯ. В то же время они отсутствуют у больных другими аутоиммунными болезнями, такими, как системная красная волчанка и хронический ревматоидный артрит [13].

Аутоиммунный ответ направлен специфически против 200К-компонента, который входит в число трех белков, составляющих триаду, характерную для (10 нм)-нейрофиламентов, и в меньшей степени против 145К- и 70К-компонентов [12]. Некоторые сыворотки лучше реагируют с 145К- или 70К-компонентами, а сыворотки овец, больных скрейпи, — с 62К-компонентом, связанным с нейрофиламентами [184a, 184b]. Антинейрофиламентные аутоантитела при БКЯ, куру и скрейпи реагируют также с отложениями нейрофиламентов, возникающими в мозгу крыс при введении  $\beta$ ,  $\beta$ -иминодипропионитрила (ИДПН), и с нейрофибрилярными сплетениями при болезни Альцгеймера.

### Предосторожности

Возможность ятрогенной передачи при «неоканнибальских» манипуляциях в современной хирургической практике привела к неоправданной панике во многих хирургических и патологоанатомических отделениях. Оказалось, что при обычных процедурах стерилизации кипячением, ультрафиолетом или ионизирующей радиацией загрязненные возбудителем БКЯ инструменты и поверхности не обеззараживаются. Вирулицидные дезинфицирующие вещества, такие, как спирт, эфир, хлороформ, ацетон, перекись водорода, формальдегид, глутаральдегид, окись этилена, иод, а также вещества, содержащие органический иод, соли четвертичных аммониевых оснований, псоралены, соединения *цис*-диаминдихлорплатины, не полностью инактивируют вирус БКЯ и скрейпи. Из-за чрезвычайно высокой устойчивости

неканонических вирусов, вызывающих куру и БКЯ у человека и скреппи у животных, к обычным обеззараживающим воздействиям в клиниках были вынуждены изменить процедуры проведения аутопсий, хирургических операций и манипуляций [14а, 33, 35, 36, 77, 185, 186]. Для дезинфекции инструментов и зараженных поверхностей рекомендуется автоклавирование при 6,7 атм в течение 1 ч и использование 5%-ного гипохлорита или 0,1 н. NaOH.

Вопрос устойчивости к инаktivации очень важен в случае вакцины против гепатита В, которую готовят из антигена, получаемого из сыворотки добровольцев; некоторые из этих добровольцев могут находиться в инкубационном периоде БКЯ. Как показано в нашей недавней работе, посвященной вариациям круга хозяев у различных штаммов возбудителя БКЯ, даже для опытов на шимпанзе требуются десятки лет, чтобы выяснить этот вопрос. Таким образом, хотя проверка на безопасность проводилась и побочных реакций не обнаружено, теоретически возможно, что вирус медленной инфекции все же присутствует в вакцине. Как показано на приматах, в случае периферического введения возможны нерегулярные заражения, но с очень длительными инкубационными периодами — более десяти лет [88]. Инфекционная природа скреппи была повторно открыта в Англии в 30-е годы, когда формализированной вакциной против вертячки овец (шотландского энцефалита), полученной из мозга овец, больных скреппи, заразили 18 000 британских овец в стадах, ранее не имевших случаев скреппи.

Таким образом, хотя присутствие возбудителя БКЯ в вакцине против гепатита В не доказано, эта опасность полностью утратит свое значение лишь при использовании вакцин из источников, исключающих человеческое происхождение (например вакцин, приготовленных с использованием рекомбинантной ДНК).

## Терапия

О выздоровлении или ремиссиях при БКЯ сообщений нет, хотя в 5% случаев с особенно длительным течением болезни трудно или даже невозможно до самой смерти отличить БКЯ от болезни Альцгеймера [34, 37]. При БКЯ и куру испытывали многие химиотерапевтические средства, но все они не давали эффекта. При экспериментальном заражении животных были предприняты более широкие попытки применения химиотерапии. С целью повлиять на инкубационный период препараты вводили до наступления симптомов. Однако и эти попытки были безуспешными [30].

## СКРЕЙПИ

## Клиническая картина

Болезнь скрейпи — это хроническая летальная атаксия овец и коз (реже). Она широко распространена в Европе, Азии и Америке (рис. 33.18). После того как болезнь была завезена с овцами, импортированными из Англии в Австралию, Новую Зеландию и Южную Африку, ее удалось ликвидировать путем изоляции зараженных отар. В Европе овцеводам это заболевание знакомо более двух столетий [40, 175—177], причем уже давно известно, что в здоровых отарах оно появляется только после включения в них отар, пораженных скрейпи. Для больных животных характерны атаксия, тремор, слабость и часто сильный зуд, который заставляет их чесаться о любой попадающийся им на дороге предмет — отсюда происходит название «скрейпи»<sup>1</sup>. Во Франции болезнь называют *tremblant* (трясучка), в Исландии — *gida* [179].

## История передачи

1899 г. Бенуа заразил овцу инокуляцией ткани мозга другой овцы, больной скрейпи [24]. Правда, инкубационный период зараженной овцы, составивший 6 мес, свидетельствует скорее о спонтанном скрейпи, чем об экспериментальном, так как в последнем случае он равен одному году. В 1936 г. Квийе и Шель подтвердили передачу скрейпи от овцы к овце и показали, что его возбудитель проходит через фильтр и обладает другими вирусоподобными свойствами [44]. Серийное экспериментальное заражение путем инокуляции тканей мозга или других внутренних органов проводили в нескольких лабораториях, используя овец различных пород [179]. Восприимчивость зависела от породы животных, причем козы были всегда восприимчивы с инкубационным периодом, редко превышающим 1 год [74, 98, 162]. Наконец, серийно передающаяся энцефалопатия была получена у мышей лишь двадцать лет назад. При этом использовали мозг экспериментально зараженной козы [41, 42] или мозг естественно зараженной овцы [155]. В настоящее время об агенте скрейпи, адаптированном к мышам и хомячкам, известно намного больше, чем о вирусах, которые вызывают болезнь человека [36, 38, 43, 46—48, 56, 59, 74, 94, 96, 114, 135, 160—170].

## Эпидемиология

Несмотря на то что скрейпи изучали дольше и интенсивнее, чем какие-либо другие заболевания этой группы, механизм его распространения в природе остается невыясненным. Оно может

<sup>1</sup> От англ. to scrap — скрейпи. — *Прим. перев.*



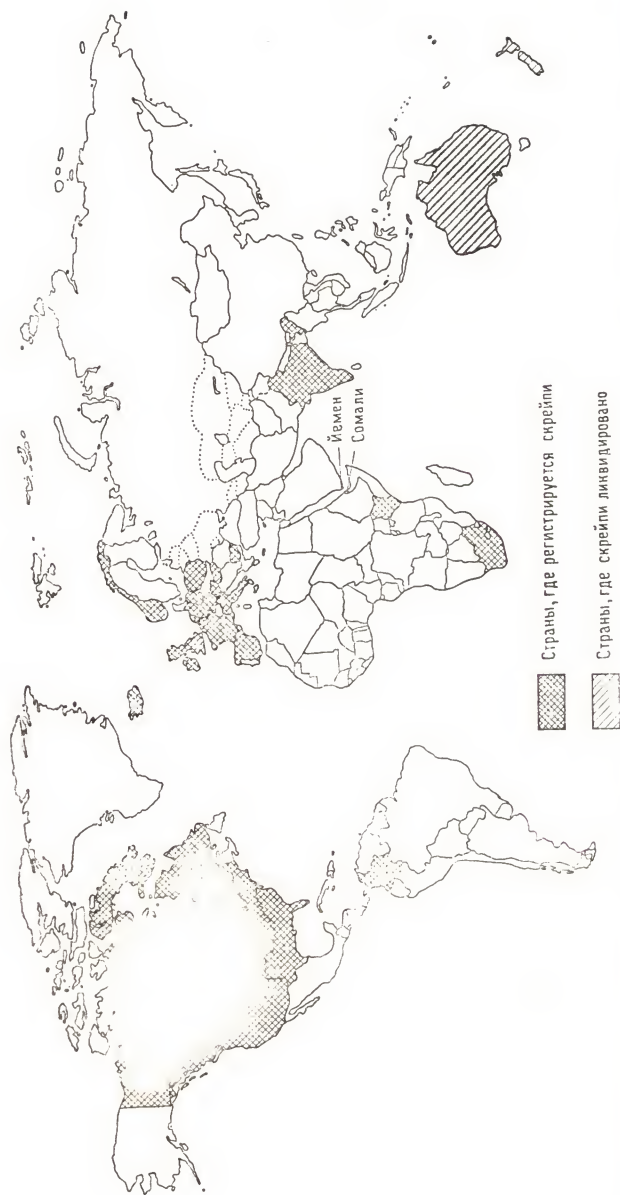


Рис. 33.18. Распределение скрепи по всему миру у овец (по данным, предоставленным д-ми Дж. Харриганом и Клинтспорном из Отдела сельского хозяйства США). Хотя в СССР официально не сообщалось о скрепи, анализ вспышки энцефалопатии норок, произошедшей в Финляндии, показал, что инфекционный материал мог быть занесен из СССР (J. Hougti-gan, личное сообщение). На Ближнем Востоке о скрепи не сообщалось.

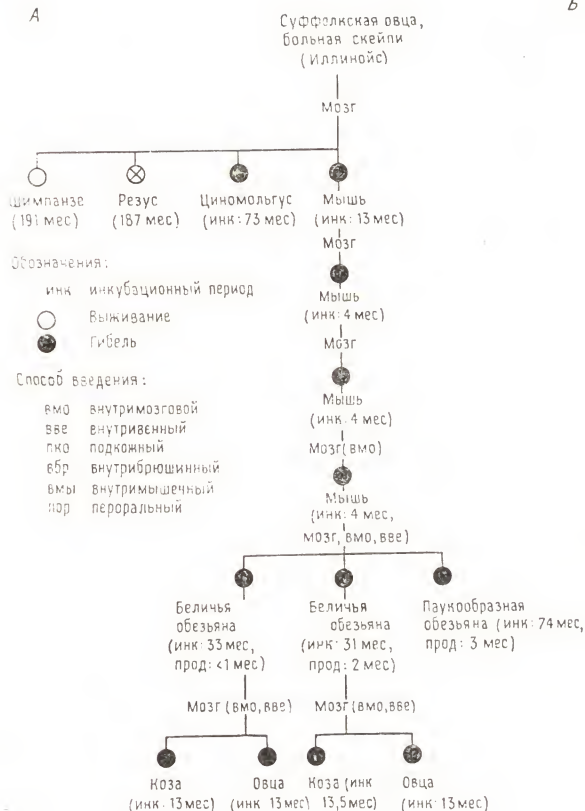
передаваться от естественно зараженных овец к незараженным овцам и козам, однако в случае экспериментально зараженных овец или коз такой латеральной передачи не наблюдали. Овцы, козы, мыши и обезьяны могут быть экспериментально заражены пероральным путем [86]. По-видимому, заболевание передается от овец к ягнятам даже без кормления; вероятно, достаточно контакта ягненка с больной овцой при рождении, так как инфекционна сама плацента [158]. Не решен вопрос о возможности трансплацентарной передачи, а также передачи в течение перинатального периода через рот, нос, глаза и кожу. Хэдлоу и др. [99] показали, что впервые вирус скрейпи появляется у молодых ягнят обычно в возрасте 10—14 мес в миндаликах, надглоточных и мезентериальных лимфатических узлах и слизистой кишечника; это указывает на алиментарный путь заражения. Взрослые овцы заражаются только при более длительном контакте с больными животными; однако известны случаи, когда восприимчивые овцы заболевали после пребывания на пастбищах, которые раньше были заняты больными овцами.

### Патология и патогенез

Природное заболевание скрейпи у овец характеризуется наличием вакуолизированных нейронов и обширным астроглиозом, в то время как при экспериментально полученном заболевании нейронная вакуолизация развивается до выраженного спонгиозного состояния [19, 22, 195]. У овец амилоидные бляшки встречаются редко, а у мышей их появление зависит от штамма вируса скрейпи и породы животных [38, 59].

Изменения плазматической мембраны, наблюдаемые при ультраструктурных исследованиях пораженного скрейпи мозга [18, 54, 125, 126], породили спекуляции о том, что вирус скрейпи может служить аномальной матрицей для укладки мембраны. При исследовании мембран методом замораживания — скалывания у мышей, зараженных скрейпи, никаких признаков присутствия вирионов или провирусов не обнаружено [54]. Суспензии мозга, содержащие вирус скрейпи, вызывают слияние клеток. Однако аналогичное слияние клеток вызывается иногда суспензиями мозга от больных, страдающих другими дегенеративными заболеваниями, а иногда и суспензиями нормального мозга. Тот факт, что это слияние стимулируется суспензией мозга хомячков в раннем инкубационном периоде, когда еще нет заметной вакуолизации, оживил интерес к этому явлению [153, 154]. Наконец, найдены ретровирусы [7, 28, 29, 84], которые вызывают вакуолизацию и спонгиозную энцефалопатию мозга диких мышей, напоминающую аналогичные признаки при скрейпи.

А



Б

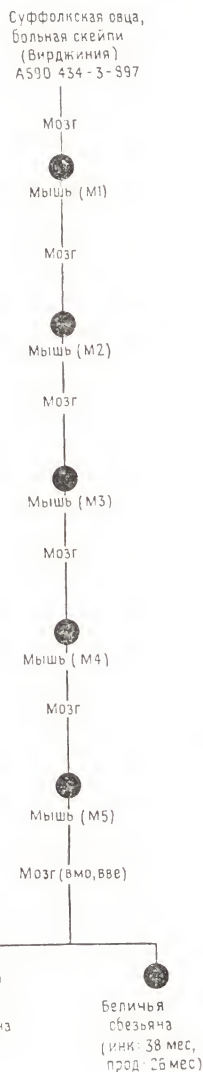
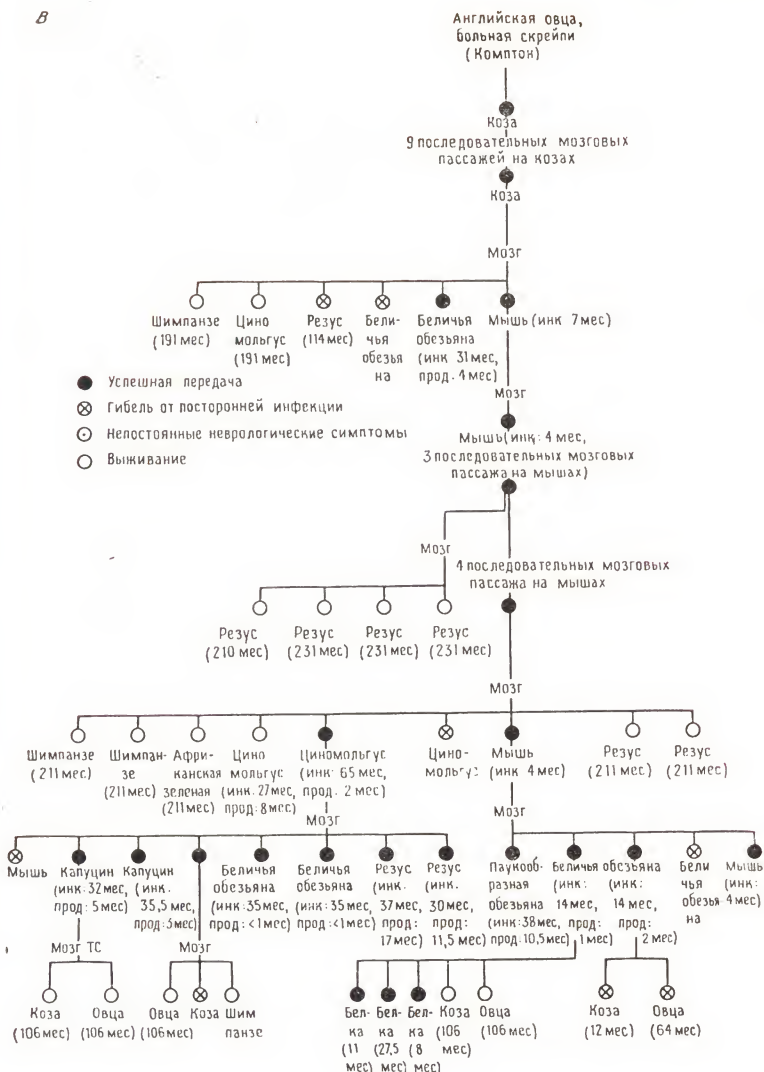


Рис. 33.19. Скрейпи была передана трем видам обезьян Нового Света и двум видам обезьян Старого Света. А. Передача вируса скрейпи из мозга зараженной овцы суффолкской породы (С506) в Иллинойсе макаку-циномольгусу и от четвертого пассажа штамма этого вируса на мышах двум беличьим обезьянам и паукообразной обезьяне. Инкубационный период для макаков-циномольгусов составил 73 мес, беличьих обезьян — 31 и 33 мес и паукообразных обезьян — 74 мес. Шимпанзе, зараженный примерно 200 месяцев назад этим штаммов вируса скрейпи, остается здоровым. Макак-резус, зараженный суспензией мозга овцы, умер от посторонней инфекции через 187 мес после заражения без пато-





логических изменений в мозгу. **Б.** Передача штамма скрепи, адаптированного к мышам (американский штамм 434-3-897), беличьей обезьяне через 38 мес после интрацеребрального введения суспензии мозга мыши, зараженной скрепи и содержащей  $10^{7.3}$  инфекционных единиц в 1 мл. У заболевших животных появляются признаки атаксии, тремора и расстройства координации; заболевание подтверждается гистологически. **В.** Первичная передача вируса скрепи, адаптированного к козам (английский штамм Комптон), беличьей обезьяне и мышам и передача вируса скрепи, адаптированного к мышам, двум видам обезьян Старого Света и трем видам обезьян Нового Света. Числа в скобках показывают время после введения, в течение которого животные оставались клинически здоровыми; инк — инкубационный период, прод — продолжительность болезни.

## Генетический контроль инфекционности

Полевые и лабораторные исследования показывают, что существует генетический контроль появления болезни у овец [74, 162]. У мышей обнаружен генетический контроль длительности инкубационного периода и анатомического распределения повреждений, которые также зависят от штамма агента скрейпи [38, 46—48, 117]. В нашей лаборатории скрейпи удалось передать пяти видам обезьян; при этом использовали суспензию мозга естественно зараженных овец и экспериментально зараженных коз и мышей (рис. 33.19). Возникшая болезнь по клиническим и патоморфологическим признакам была неотличима от экспериментальной БКЯ в этих видах [87, 88]. Попытка передачи скрейпи шимпанзе была безуспешной.

## Вирус скрейпи

Вирус скрейпи частично очищен седиментацией в градиенте плотности [178], причем более эффективно очистку осуществляют в присутствии детергента [160]. Инфекционная активность скрейпи легко осаждается при ультрацентрифугировании. Осажденный, промытый и ресуспендированный вирус подвергают равновесному центрифугированию в градиентах хлористого цезия, сахарозы или метризамида с образованием зоны с высокой инфекционностью. Равновесное центрифугирование вируса скрейпи из суспензии мозга мыши в градиенте сахарозы дает широкие пики инфекционности с плотностями от 1,14 до 1,23 г/мл.

При электронно-микроскопическом исследовании фракций с высокой инфекционностью ( $10^7$  или  $10^8$  ЛД<sub>50</sub>/мл) выявляются только гладкие везикулярные мембраны с остатками рибосом и митохондрий и не видно никаких структур, напоминающих вирионы. Лизосомные гидролазы (N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза: β-галактозидаза и кислая фосфатаза) и митохондриальный маркерный фермент (INT-сукцинатредуктаза) имеют максимальную активность не во фракциях, обладающих максимальной инфекционностью, а во фракциях с меньшей плотностью [178]. Электронно-микроскопическое исследование мозга и селезенки зараженных животных, содержащих высокий титр вируса, не позволило четко выявить вирусоподобные структуры, хотя у зараженных мышей (но не у зараженных хомячков) наблюдается накопление частиц в пресинаптических окончаниях [15, 54].

Рохвер и Гайдушек добились 1000-кратной очистки вируса в расчете на другие белки исходной суспензии мозга [170]. В таких препаратах вирус чувствителен к протеиназе К и трипсину и не чувствителен к нуклеазам. Попытки обнаружить в вирусе скрейпи нуклеиновую кислоту нехозяйского происхождения пу-

тем исследования гомологии [26], трансфекции [27] и инактивации нуклеазами [105] были безуспешными.

Идентифицирован скрейпи-специфический белок с мол. массой  $\sim 30\text{К}$ . Он оказался очень гидрофобным и склонным к агрегации [163, 164]. Прузинер и сотр. [161] называют его «белком приона», он агрегирует с образованием фибрилл, напоминающих ФСС Мерц [147—151] (рис. 33.1). Эти фибриллы сходны с фибриллами амилоида и по форме, и по характеру окрашивания (рис. 33.2) [163]. Антитела к «белку приона» реагируют с «прионовыми палочками» (ФСС) из тканей мозга, зараженного скрейпи, куру и БКЯ, а также с амилоидными отложениями в тканях мозга зараженных скрейпи хомячков [24a].

Для инактивации вируса скрейпи УФ-светом характерно 6-кратное повышение его чувствительности при 237 нм по сравнению с 254 или 280 нм и 50-кратное при 220 нм. Это нетипичное поведение нельзя рассматривать как доказательство отсутствия у агента скрейпи генетической информации в форме нуклеиновой кислоты. Латарже и др., например, обнаружили сходную устойчивость к ультрафиолету и сходный спектр действия ультрафиолета у микросом. Устойчивость к ультрафиолету сильно зависит от размера РНК, что показано на примере высокой устойчивости очищенной очень маленькой РНК вируса-сателлита вируса некроза табака ( $\sim 80\text{К}$ ) [1—3, 90, 100, 127, 128].

Неканонические вирусы обладают рядом свойств, сближающих их с классическими вирусами (табл. 33.3), причем некоторые из этих свойств указывают на более сложные генетические взаимодействия между вирусом и хозяином, чем это можно было ожидать для генома, имеющего размер всего 100К. При определении методом ультрафильтрации их размер составляет 30—50 нм. Они являются истинно медленными вирусами, поскольку время удвоения вируса скрейпи в хомячках равно 5,2 дня [167].

В очищенном состоянии вирус скрейпи устойчив ко всем нуклеазам, но инактивируется протеиназой К и другими протеазами [160, 170]. После обработки формальдегидом, глутаральдегидом, хлороформом, эфиром, ацетоном, дезоксихолатом, иодом, органическими дезинфектантами, содержащими иод, фенолом, перманганатом калия, перекисью водорода, солями четвертичных аммониевых оснований, псораленами [145] и соединениями дис-диаминодихлорплатины (Р. Brown, неопубликованные данные) остается заметная остаточная инфекционность. Вместе с тем, как это ни удивительно, 5%-ный гипохлорит и 0,1 н. гидроксид натрия являются в этом случае очень эффективными дезинфектантами. Вирус скрейпи обратимо инактивируется хаотропными ионами, такими, как тиоцианат, гуанидиний, и трихлорацетат; ионы аммония предотвращают эту инактивацию и могут даже ее обратить (табл. 33.4) [146].



Таблица 33.4. Методы инактивации неканонических вирусов

---

Автоклавирование (60 мин, 121 °С, 6,7 атм)
Гидроксид натрия (0,1—1,0 н.)
Гипохлорит (хлорокс) (5,0%-ный)
Фенольная экстракция
Хлороформ или хлороформ с бутанолом
Сильные детергенты
Протеиназа К
Хаотропные ионы (тиоцианат, гуанидиний, трихлорацетат)
2-Хлорэтанол
Перманганат калия (0,002M)

---

Высокая устойчивость к инаktivации может быть также обусловлена склонностью гидрофобных вирусов скрейпи к агрегации. При этом наиболее вероятна многоударная кинетика инаktivации как химическими, так и физическими агентами, а не одноударная, свойственная мономерным формам вирусов [166, 168, 170].

Несмотря на необычную устойчивость значительной субфракции инфекционных частиц к нагреванию, основная часть частиц быстро инаktivируется при температуре выше 85 °С [167]. Автоклавирование (120 °С при 6,7 атм в течение 60 мин) полностью инаktivирует вирус скрейпи в суспензии мозга мышей. При медицинских процедурах и при обработке материалов от больных, зараженных неканоническими вирусами, мы предлагаем использовать 0,1—1,0 н. NaOH [33, 35, 36].

Субвирусные патогенные агенты известны и в вирусологии растений. Чтобы отнести их к вирусам, исследователям придется пересматривать и изменять представление о вирусах. К ним относится, например, новая группа виридов, вызывающих 11 природных заболеваний у растений: веретеновидность клубней картофеля, карликовость хризантем, экзокортис цитрусовых, болезнь Каданг-Каданг кокосовых пальм, хлоротическая крапчатость вишни, бледность плодов огурца, карликовость хмеля, солнечные ожоги авокадо, кустистость верхушек томатов, болезнь «планта махо» томатов и карликовость лопуха [51, 52, 174]. Все вириды представляют собой маленькие кольцевые РНК, не содержащие ни структурного белка, ни мембраны; определена нуклеотидная последовательность и вторичная структура всех этих РНК. При складывании кольца с образованием дуплекса их основания спариваются лишь частично. РНК содержат от 246 до 574 рибонуклеотидов и реплицируются по механизму катящегося кольца, копируя свою последовательность при многочисленных последовательных оборотах с образованием олигомерных копий, которые затем нарезаются на мономеры или иногда на димеры. Эти новосинтезированные молекулы не ис-

пользуются для синтеза каких-либо белков. С этой целью вирус использует только репликационный аппарат клетки. Австралийские фитопатологи идентифицировали вируссоиды четырех природных болезней (бархатистой крапчатости табака, крапчатости *Solanum nodiflorum*, преходящей полосатости люцерны и подземной крапчатости клевера). В дополнение к каноническому геному, состоящему из РНК размером  $>1000K$ , они содержат маленькую кольцевую РНК размером с вирион, которая для своей репликации нуждается в присутствии большого генома [174].

У исследователей возникло естественное желание сравнить этих субвирусных возбудителей с неканоническими вирусами [49, 50]. Однако последние отличаются от вирионов растений практически по всем признакам [52, 160, 174, 188]. Таким образом, аналогия между неканоническими вирусами и вирионами и вируссоидами оказалась ошибочной; однако субвирусные возбудители заболеваний растений заставляют нас помнить о возможности довольно далекого отхода от канонических вирусных структур.

Дельта-антиген инфекционного гепатита — дефектная реплицирующаяся частица, имеющая всего 1700 оснований в геноме (мол. масса 68K) и требующая для репликации присутствия инфекционного вируса гепатита В, представляет собой еще одну интересную аналогию неканоническим вирусам.

### Фибриллы, связанные со скрейпи

В суспензиях мозга, пораженного скрейпи, Мерц и др. [149, 150] нашли амилоидоподобные двух- и четырехцепочечные волокна, которые увеличивались в количестве по мере возрастания титра. В сотрудничестве с Мерц и Вишневецки мы обнаружили эти структуры в мозгу больных БКЯ и приматов с экспериментальной БКЯ и куру, но не нашли их в нормальном мозгу и мозгу больных другими нейродегенеративными заболеваниями (табл. 33.5) [70, 147, 148, 151]. Высказано предположение, что эти структуры представляют собой инфекционные агенты скрейпи, БКЯ или куру (рис. 33.1) [53, 70, 149, 163]. Они напоминают нитчатый бактериофаг fd и нитевидные вирусы растений, которые имеют примерно такой же диаметр.

Фибриллы, связанные со скрейпи, можно структурно отличить от парных спиральных филаментов при болезни Альцгеймера и при паркинсонизме — деменции типа Гуам, а также классических амилоидных фибрилл при болезни Альцгеймера и нормальном старении мозга [147, 148, 151]. Однако сходство перечисленных выше структур очень велико. Моноклональные антитела против нормальных нейрофиламентов и аутоиммунные олигоклональные антитела больных БКЯ, куру и скрейпи реагируют

Таблица 33.5. Медленные инфекции человека, вызываемые каноническими вирусами

Болезнь	Вирус
<p>Подострый послекоровой лейкоэнцефалит</p> <p>Подострый склерозирующий панэнцефалит (ПСПЭ)</p> <p>Подострый энцефалит</p>	<p>Парамиксовирус — вирус кори</p> <p>То же</p> <p>Герпесвирус — HSV</p>
<p>Прогрессирующая врожденная краснуха</p> <p>Прогрессирующий панэнцефалит как последствие врожденной краснухи</p> <p>Прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия (ПМЛ)</p>	<p>Аденовирус — аденовирусы типов 7 и 32</p> <p>Тогавирус — вирус краснухи</p> <p>Тогавирус — дефектный вирус краснухи</p>
<p><i>Varicella vulgaris</i> (бородавки)</p> <p>Цитомегаловирусная инфекция мозга</p> <p>Хронический инфекционный мононуклеоз</p> <p>Эпилепсия Кожевникова и прогрессирующий бульбарный паралич в СССР</p> <p>Хронический менингоэнцефалит больных с иммунодефицитом</p> <p>Гомологичная сывороточная желтуха</p>	<p>Паповавирус — JC; SV40</p> <p>Паповавирус — вирус бородавок</p> <p>Герпесвирус В — CMV</p> <p>Герпесвирус — EBV</p> <p>Тогавирус — вирус клещевого энцефалита и другие вирусы, переносимые клещами</p> <p>Пикорнавирусы — вирус полиомиелита, ЕСНО</p>
<p>Инфекционный гепатит</p> <p>Гепатит ни А, ни В, связанный с переливанием крови</p> <p>Эпидемический гепатит ни А, ни В</p> <p>Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД, саркома Капоши)</p> <p>Т-клеточный лейкоз</p>	<p>Гепаднавирус В — вирус гепатита В (частицы Дейна)</p> <p>Гепаднавирус D — дефектный дельта-антиген</p> <p>Пикорнавирус — вирус гепатита А</p> <p>Неклассифицированный вирус ни А, ни В</p> <p>То же</p> <p>Ретровирус (лентивирус) — Т-лимфотропные вирусы</p> <p>Ретровирус (онковирус) — HTLV-I, HTLV-II</p>



с нормальными (10-нм)-нейрофиламентами и нейрофибриллярными сплетениями при болезни Альцгеймера, а также с отложениями нейрофиламентов в нейронах крыс, обработанных ИДПН. Интересно узнать, реагируют ли эти аутоиммунные антитела или какие-либо моноклональные антитела к нормальным нейрофиламентам с фибриллами, связанными со скрейпи (ФСС), амилоидом в тканях мозга, а также с парными спиральными филаментами при болезни Альцгеймера и нормальном старении мозга. Это особенно важно в связи с тем, что Прузинер [163] сообщил о склонности белка, связанного со скрейпи, агрегировать с образованием фибрилл, которые и по структуре, и по характеру окрашивания напоминают амилоид.

Аутоантитела при БКЯ, куру и скрейпи реагируют с нейрофиламентами и содержащими парные спиральные филаменты нейрофибриллярными сплетениями, обнаруживаемыми при болезни Альцгеймера и нормальном старении мозга. Но не выяснено, сходны ли какие-либо антигенные детерминанты нейрофиламентов в амилоиде и ФСС, которые выявила Мерц, с белком, связанным со скрейпи, который выделил Прузинер. Мы предположили, что нарушение аксонного транспорта может вести к аномалиям нейрофиламентов (образованию НФС, содержащих ПСФ) и появлению амилоидных бляшек — двум аспектам одного и того же нарушения метаболизма и транспорта. И наконец, самой радикальной гипотезой можно считать представление о том, что неканонические вирусы произошли из генетических элементов, кодирующих белки нейрофиламентов и иммуноглобулины.

Если ФСС действительно представляют собой вирус скрейпи, то в этом случае он служит примером истинно неканонического вируса животных, даже если он и имеет соответствующие аналоги среди бактериофагов и вирусов растений. Однако самый кардинальный вопрос состоит в том, содержит ли при этом вирус скрейпи (и куру, и БКЯ) информацию для своей репликации в форме внутренней геномной нуклеиновой кислоты. В том случае, если окажется, что он не содержит генома, «романтики», которые раньше на основании недостаточных данных развивали представление о том, что он является совершенно новой формой реплицирующегося микроба — чистым белком (возможно, нейрофиламентом, обладающим гомологией с иммуноглобулином) без ДНК или РНК, окажутся правы. Более консервативные исследователи, считающие, что он должен содержать ДНК или РНК (хотя доказательств этому пока получить не удастся), опираются в своей позиции на основные догмы микробиологии. Они также подчеркивают, что доводы, выдвигаемые в пользу альтернативной точки зрения, несостоятельны из-за высокой степе-

ни агрегации гидрофобной инфекционной единицы скрейпи и недостаточной надежности результатов титрования *in vivo* на мышах и хомячках.

### ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ НОРОК

Трансмиссибельная энцефалопатия норок (ЭН) чрезвычайно сходна со скрейпи по клинической картине и патоморфологическим изменениям. На ранчо в штате Висконсин, где это заболевание было впервые обнаружено в 1947 г., норкам скармливали туши больных скрейпи овец. Заболевание, зарегистрированное на фермах Канады и Финляндии, передается от норки к норке при драках животных и каннибализме [101]. Оно неотличимо от болезни, развивающейся при экспериментальном заражении скрейпи материалом, взятым от овец или мышей [135].

Подобно скрейпи, ЭН передается перорально, однако трансплацентарная и перинатальная передача от матери не обнаружена. Заболевание было привито бѐлкам, макакам-резусам, короткохвостым обезьянам и многим видам приматов, включая овцу, козу и хорька; оно не передается мышам. Потерю патогенности для исходного хозяина наблюдали и при других переносах этих вирусов новому хозяину, как, например, при пассировании мышиногo или овечьего агента скрейпи на норках. Аналогичным образом штамм козьего агента скрейпи Комптон при пассажах на приматах теряет патогенность для овец. У обезьян заболевание, вызываемое агентом ЭН, неотлично от экспериментального БКЯ. При физико-химическом изучении вируса пока не выявилось никаких различий между вирусами ЭН и скрейпи [74].

### СПОНГИОЗНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ ЛОСЕЙ И ОЛЕНЕЙ

В 1978 г. в стадах Форт-Коллинса, шт. Колорадо было замечено заболевание, названное хроническим истощением одомашненных оленей. Его клиническая картина и невропатология напоминают подострую спонгиозную энцефалопатию скрейпи у овец и коз [190]. Это заболевание экспериментально передается другим оленям [192]. Бахманьяр и др. [14] показали, что у большинства оленей образуются амилоидные бляшки. В мозгу пораженных болезнью оленей находят амилоидные фибриллы и фибриллы, связанные со скрейпи (Р. Merz, личное сообщение). В настоящее время хроническое истощение с подострой спонгиозной энцефалопатией регистрируется в соседних стадах одомашненных лосей [191].

## ПРОИСХОЖДЕНИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ КУРУ

Принципиальные неразрешенные вопросы, общие для всех этих агентов, связаны с их биологическим происхождением и способом существования в природе. Болезни, которые они вызывают, не являются искусственными заболеваниями, обусловленными манипуляциями исследователей, работающих с клеточными макромолекулярными структурами. Они представляют собой природные болезни, причем ни для одной из них мы не знаем механизм распространения и сохранения, который бы адекватно объяснял их длительное существование. В случае куру мы имеем полное объяснение уникальных эпидемиологических наблюдений и их динамики на протяжении последних двух десятилетий: заражение близких родственников при вскрытии умерших и ритуальном каннибализме, в ходе которого девочки, женщины, грудные дети и подростки из семьи погибшего от куру массированно заражались вирусом. Постепенно по мере прекращения каннибализма болезнь исчезает; она уже не встречается у детей, подростков и молодых взрослых, а возраст самых молодых заражающихся постоянно увеличивается. Однако эта информация не дает нам исчерпывающего объяснения происхождения куру. Было бы не удивительно, если бы спорадический случай БКЯ, распространенной по всему миру, в условиях необычных культурных традиций Новой Гвинеи привел к уникальной эпидемии. Спонтанный случай БКЯ был зарегистрирован у 26-летней женщины племени Чимбу в центральном горном районе Новой Гвинеи, у которой клинический диагноз был подтвержден световой и электронной микроскопией биоптата мозга [104]. Серийные пассажи мозга у людей при каннибальском ритуале могли привести к изменению клинической картины болезни, а также вирулентности исходного агента.

Если происхождение куру не обусловлено подобным спонтанным случаем БКЯ, можно представить себе альтернативный вариант. Он состоит в том, что новый нейротропный штамм мог возникнуть в результате серийных пассажей некоторых других вирусов, которые проходили множество пассажей на представителях клана (при заражении мозгом после очередного ритуала). Наконец, зная, что происходит при дефектной репликации вируса кори у больных подострым склерозирующим панэнцефалитом (ПСПЭ), можно предположить, что повсеместно распространенные или по крайней мере хорошо изученные вирусы могли *in vivo* в ходе длительного маскирования у индивидуального хозяина модифицироваться с образованием дефектного, неполного или высокоинтегрированного или репрессированного агента. Такой новый изолят трудно узнается и антигенно, и структурно из-за его неспособности к синтезу полноценных



субъединиц и сборке в вирионы с известными свойствами. Таким образом, возникает вопрос, не содержит ли вирус куру каких-либо субъединиц известного агента, модифицированных в ходе необычной предыстории его пассирования.

### **ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ ОБЩАЯ ЕСТЕСТВЕННАЯ ИСТОРИЯ БКЯ, КУРУ, ЭН И ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ОЛЕНЕЙ И ЛОСЕЙ**

Ни инкубационный период, ни круг хозяев, ни распределение или тяжесть нейропатологических поражений не могут считаться решающими при выявлении возможных связей четырех или более вирусов, вызывающих эти подострые спонгиозные энцефалопатии.

В настоящее время установлено, что вирус скрейпи вызывает заболевание, клинически и невропатологически неотличимое от экспериментальной БКЯ и куру у трех видов обезьян Нового Света и двух видов обезьян Старого Света [87, 88]. Заболевание может возникать при интрацеребральном или периферическом введении. У обезьян его вызывает как природный штамм скрейпи овец, так и экспериментальные штаммы мышей и коз. У штамма Комптон в результате таких пассажей на приматах изменился круг хозяев; он не вызывал больше заболеваний при введении мышам, овцам и козам [88]. Аналогичная ситуация отмечена при проведении агента скрейпи через хорьков и норок; норковый и хорьковый штаммы не обладали патогенностью для мышей. Это же справедливо и для вируса природной энцефалопатии норок, который, вероятно, произошел от вируса скрейпи после скормливания домашним норкам туш овец, больных скрейпи (рис. 33.20) [134a].

Вирусы БКЯ и куру после бессимптомной инкубации более двух лет могут давать заболевание ЦНС у беличьих обезьян, заканчивающееся смертью через несколько дней. При этом отмечены даже внезапные смерти без выраженных клинических симптомов. Те же штаммы БКЯ и куру дают хроническую инфекцию у паукообразных обезьян, которая очень напоминает заболевание человека, наступающее после двухлетней или более продолжительной инкубации. Временная последовательность развития болезни также напоминает протекание болезни у человека; при этом варьирует лишь длительность периода до смерти от нескольких месяцев до более одного года. Один и тот же штамм вируса БКЯ или куру вызывает выраженное спонгиозное перерождение во многих отделах мозга, особенно в коре у шимпанзе и паукообразных обезьян при минимальном поражении ствола и спинного мозга, в то время как у беличьих обезьян тот же самый штамм вызывает обширные повреждения ствола и спинного мозга. Как вирус куру, так и вирус БКЯ вы-

зывают похожее на скрейпи заболевание у коз, но не у овец [88].

Мы обнаружили, что распространенность БКЯ в США и за рубежом приблизительно одинакова и составляет  $\sim 1$  случай на 1 млн. человек, если проводить широкое неврологическое обследование. При обследовании, проведенном в Израиле, выявлено, что евреи ливийского происхождения заболевают примерно в 30 раз чаще, чем евреи европейского происхождения [111, 156]. Обычай употреблять в пищу глаза и мозги овец у ливийских евреев в отличие от евреев европейского происхождения по понятной причине послужил основой для предположения, что источником БКЯ могла быть зараженная скрейпи баранина [92а, 102]. Овечьи головы входят в рацион многих этнических групп в США и за рубежом.

На рис. 33.20 схематически представлена естественная история подострых спонгиозных вирусных энцефалопатий, в которой в качестве гипотетической причины БКЯ, куру, ЭН и энцефалопатии одомашненных оленей и лосей предполагается природный агент скрейпи овец и указаны возможные пути передачи. Хотя эту теоретическую схему пока нельзя доказать, она может иметь эвристическую ценность. Поскольку доказательств антигенности и наличия нуклеиновой кислоты нет, для ответа на интригующий вопрос о связи между вирусами куру, БКЯ, скрейпи, ЭН и хронического истощения оленей и лосей, к сожалению, нельзя использовать ни серологические тесты, ни гомологию нуклеиновых кислот.

Очень привлекательно предположение о том, что вирусы, вызывающие все шесть подострых спонгиозных энцефалопатий, не просто родственны, но являются различными штаммами одного и того же вируса, модифицированными пассированием на различных хозяевах. Передача скрейпи от овцы к овце или козе, по крайней мере путем скармливания пищи, загрязненной в результате контакта с плацентой и оболочкой плода, и норкам при кормлении их тушами овец, больных скрейпи, — установленный факт [158]. Трансмиссибельная энцефалопатия одомашненных оленей и лосей также могла возникнуть из-за заражения пастбищ агентом скрейпи. В свете данных об экспериментальной передаче скрейпи обезьянам [57] и БКЯ и куру козам с возникновением заболевания, подобного скрейпи [88], не исключено, что одним из путей заражения человека БКЯ являются травмы, в частности производственные травмы мясников, при которых возможен контакт возбудителя с кожей и глазами. Мы считаем, что единственным путем передачи куру от человека к человеку было заражение при каннибальском ритуале, и предполагаем, что спонтанный случай БКЯ дал начало цепочке последовательных заболеваний куру. Документированный случай заражения БКЯ при пересадке роговицы подтверждает,

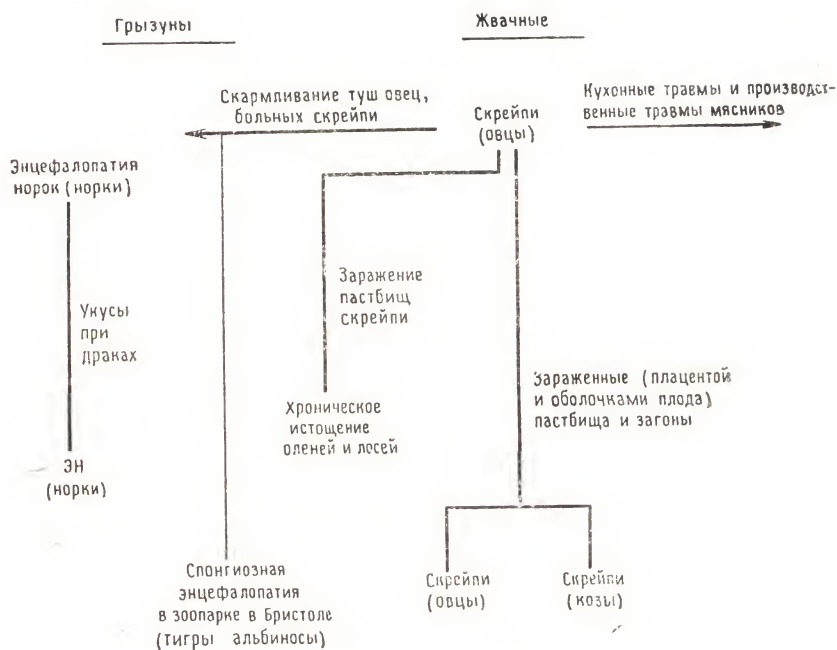
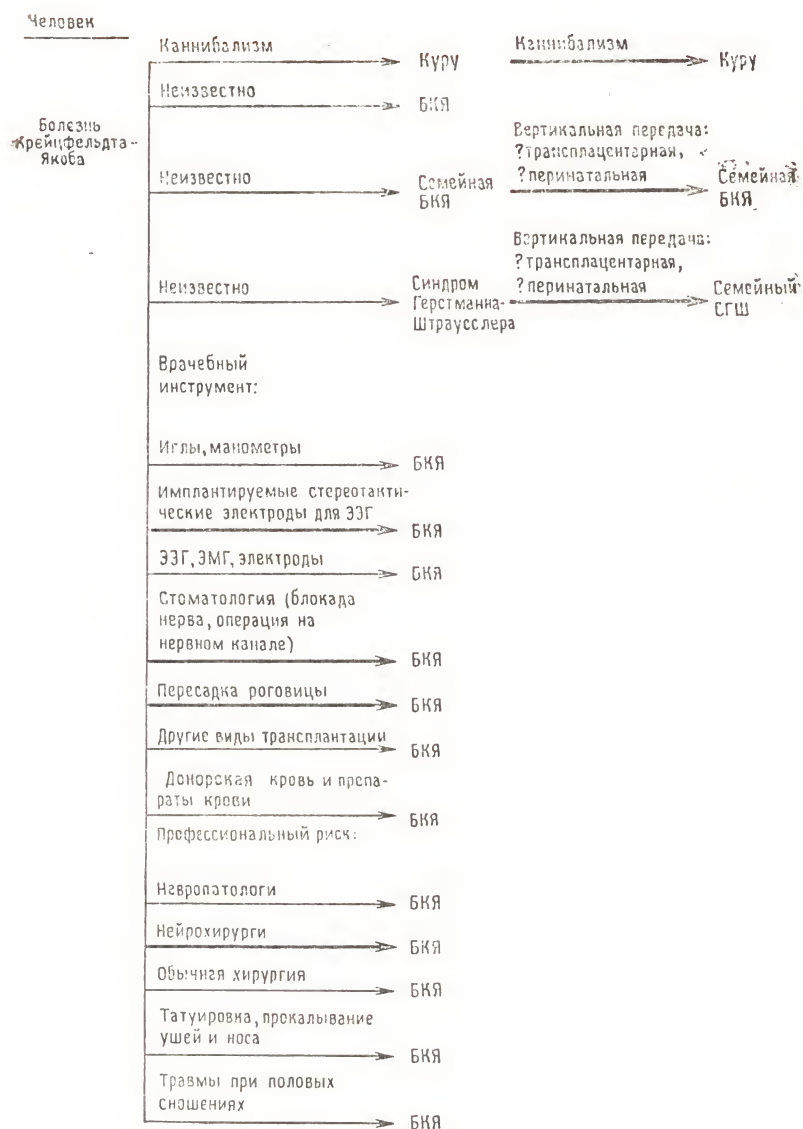


Рис. 33.20. Схема общей естественной истории подострых спонгиозных вирус- и хроническое истощение одомашненных оленей и лосей произошли от природ-толстыми линиями.





ных энцефалопатий. Предполагают, что БКЯ, куру, энцефалопатия норки (ЭН) и скрейпи овец. Установленные или вероятные пути передачи выделены

что и другие операции по трансплантации органов также могут быть источником заражения [55]. Известно, что вирус присутствует как в мозгу, так и в периферических тканях. Случай БКЯ у нейрохирурга, который часто производил аутопсии, поставил вопрос о возможности профессионального риска у нейрохирургов и невропатологов; два врача и несколько дантистов также умерли от БКЯ. И наконец, отмеченная нами и другими связь между предшествовавшей операцией и возникновением БКЯ [23, 55, 58, 138, 157, 189] указывает на то, что хирургическая операция могла быть источником заражения БКЯ, а не причиной активации вируса. Подобная опасность реальна в свете двух случаев, когда произошло заражение БКЯ двух больных эпилепсией. Этим больным вирус БКЯ передали, видимо, на серебряных электродах при стереотактической электроэнцефалографии во время хирургической операции [23]. Использование формальдегида для дезинфекции было недостаточным, так как вирус при этом не инактивируется [78]. БКЯ у дантиста и двух его пациентов показывает, что стоматологические манипуляции также могут служить путем распространения [189]. При экспериментальном заражении животных вирус скрейпи был выделен из зубного нерва. Путь передачи при семейной форме БКЯ на первый взгляд представляется вертикальным, но точно он не доказан. Является ли этот путь трансвариальным или происходит *in utero*, или в ходе родов, или через молоко, остается неясным. Эпидемиологические данные по куру (например, отсутствие куру у детей, рожденных от больных куру матерей после прекращения каннибализма) ничего не говорят о наличии такой передачи.

#### **ПОПЫТКИ ОБНАРУЖИТЬ ВИРУС ПРИ ДРУГИХ ХРОНИЧЕСКИХ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

Высказано предположение, что многие другие хронические болезни человека могут быть медленными вирусными инфекциями. В нашей и других лабораториях накопились эпидемиологические данные, которые указывают на то, что рассеянный склероз и болезнь Паркинсона, системная красная волчанка, ювенильный диабет (первого типа, инсулинзависимый), полимиозит, некоторые формы хронического артрита и даже широко обсуждаемый в последнее время синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) могут быть медленными инфекциями, вызываемыми маскированным или дефектным вирусом.

Наши попытки установить вирусную этиологию болезни Альцгеймера, болезни Пика, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, прогрессирующего супрануклеарного паралича, бокового амиотрофического склероза, шизофрении и аутизма у де-

тей и многих других хронических невоспалительных заболеваний ЦНС человека были безуспешными, за исключением группы заболеваний, приведенных выше. Отрицательные результаты, получаемые уже длительное время при изучении этих болезней (включая наследственное заболевание Хантингтона и болезнь Джозефа), приобретают все большее значение при обсуждении возможной роли медленных вирусов в их этиологии и при планировании дальнейших исследований их патогенеза. Для обнаружения вируса, который может содержаться в мозгу животных, мы использовали не только шимпанзе из питомников и лабораторных животных неприматного происхождения. Мы применяли также технику кокультивирования культур тканей со многими клеточными линиями и другие системы культур ткани *in vitro*. Зараженные культуры клеток анализируют на присутствие вирусных антигенов и вирусной обратной транскриптазы; их исследуют с помощью электронного микроскопа на наличие вирусоподобных частиц, иммуофлуоресценции с антителами против известных вирусов и ДНК-гибридизации *in situ* с зондами, выявляющими нуклеиновые кислоты известных вирусов.

#### **ПОПЫТКА СОЗДАТЬ ОБЩУЮ ГИПОТЕЗУ ПАТОГЕНЕЗА МНОГИХ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЦНС**

Многие парадоксы, с которыми мы столкнулись при открытии неканонических вирусов—возбудителей хронических прогрессирующих дегенеративных болезней ЦНС (в том числе тех, которые определяются доминантным аутосомным геном по Менделю), и вызываемые медленными инфекциями патологические повреждения (напоминающие повреждения в мозгу при старении) с нейрофибриллярными сплетениями (НФС) и амилоидными бляшками (обычно проявляющиеся при старческой деменции альцгеймеровского типа) в конечном итоге поддаются объяснению.

Исследование различных областей с высокой частотой хронических неврологических заболеваний в западной части Тихого океана помимо района куру (например, очагов высокого распространения бокового амиотрофического склероза и паркинсоновской деменции и связанного с этими заболеваниями появления НФС у молодых представителей племени Чаморро на о. Гуам, у японцев на полуострове Кии и у представителей племен Ауйу и Джакаи на западе Новой Гвиней [60, 65, 68]) показало, что различные и несвязанные феномены может объединять одно обстоятельство. Оно заключается в том, что в клетках мозга человека вследствие вторичного гиперпаратироза, развивающегося в ответ на дефицит кальция и магния в окружающей среде, может раньше обычного откладываться гидроксипатит.



В виде гидроксипатитов откладываются кальций и другие дивалентные элементы [85, 159].

НФС образуются при хронических вирусных инфекциях мозга, таких как ПСПЭ и хроническая инфекция, вызываемая вирусом краснухи, а амилоидные бляшки появляются при заражении некоторыми штаммами вирусов скрейпи, куру и БКЯ в подходящем хозяине. Образование НФС у человека можно вызвать также интоксикацией алюминием (как при диализной деменции) и введением в эксперименте крысам хлорида алюминия или ИДПН. Клетки мозга больных с синдромом Дауна, которые доживают до тридцатилетнего возраста, так же как и клетки мозга боксеров с травматической энцефалопатией, содержат НФС. Таким образом, вирусные инфекции, дефицитные состояния, токсические и генетические факторы и даже травма ведут к одному и тому же патогенезу и образованию НФС и амилоидных бляшек.

В результате нарушается аксонный транспорт нейрофиламентов. Мы склонны считать, что (10-нм)-нейрофиламенты играют ключевую роль во всем процессе [134]. Их синтез в перикарионе и конвейерный транспорт по всей длине аксона требуют высокой скорости оборота. Они должны быть необычно активными антигенами, поскольку при заболеваниях мозга в большей степени, чем другие макромолекулы ткани мозга вызывают аутоиммунный процесс [11—13, 180—182].

Хирано и сотр. наблюдали повреждения моторных нейронов при боковом амиотрофическом склерозе, которые не удавалось обнаружить в течение целого столетия, поскольку к моменту смерти большая часть моторных нейронов погибает, а та часть, которая остается, выглядит нормально. Они исследовали ткани умершего на ранней стадии бокового амиотрофического склероза (через 10 мес после начала). При ультраструктурных исследованиях они обнаружили раздувшиеся моторные нейроны, заполненные массой скоплений (10-нм)-нейрофиламентов (рис. 33.21) [103, 108]. Судя по иммуофлуоресценции, это были нормальные (10-нм)-нейрофиламенты [83]. Полагают, что из (10-нм)-нейрофиламентов образуются также НФС и парные спиральные филаменты при болезни Альцгеймера и при старении мозга.

Таким образом, показана связь между боковым амиотрофическим склерозом и НФС при старении мозга, болезни Альцгеймера, паркинсоновской деменции, — связь, на которую указывают эпидемиологические данные, полученные в очагах с высокой заболеваемостью боковым амиотрофическим склерозом и паркинсоновской деменцией.

Исследования Хирано моторных нейронов при боковом амиотрофическом склерозе свидетельствуют о том, что нарушен пе-

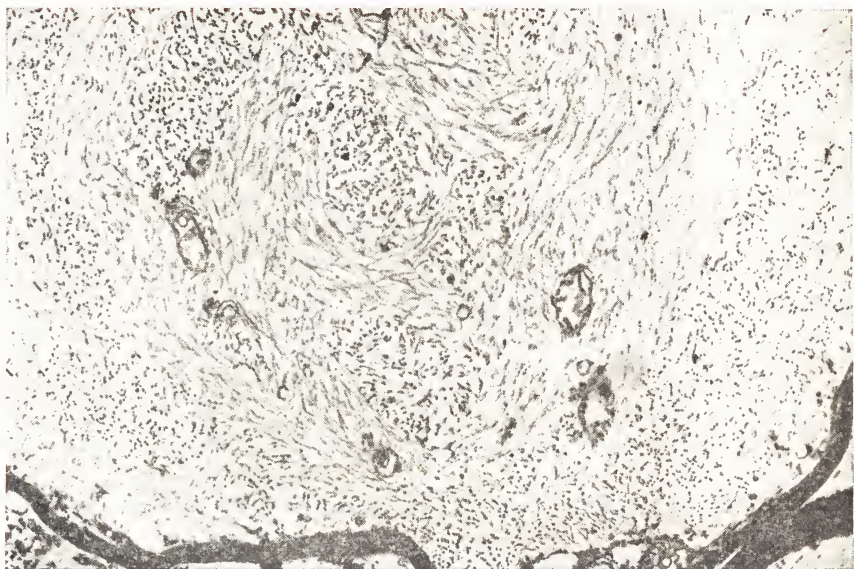


Рис. 33.21. Клетки переднего рога и спинного мозга больного боковым амиотрофическим склерозом, который умер в начале болезни (через 10 месяцев после начала) и вскрытие которого произвели менее чем через 4 ч после смерти. Перикарион нейронов вздут, и в нем видны скопления нерегулярно упакованных (10-нм)-нейрофиламентов. Эти нейрофиламенты специфически реагируют с антисыворотками к нормальным нейрофиламентам, что выявляется по иммунофлуоресценции [83]. (С любезного разрешения д-ра А. Хирано, Нью-Йорк.)

ренос (10-нм)-нейрофиламентов вдоль аксонного цилиндра. В то же время синтез этих макромолекулярных структур продолжается, что приводит к заполнению ими аксонного цилиндра и перикариона нейрона. Сходное заполнение нейрофиламентами происходит у крыс, отравленных хлоридом алюминия или ИДПН, которые нарушают аксонный транспорт. Можно предположить, что быстро метаболизирующий моторный нейрон скорее заполняется нейрофиламентами, в то время как в более медленно метаболизирующих нейронах нарушения происходят более медленно и в них появляются НФС, содержащие парные спиральные филаменты. Таким образом, механизм, приводящий к образованию НФС и парных спиральных филаментов, индуцированных либо вирусом, либо токсином, либо недостаточностью каких-то факторов, заключается в нарушении транспорта вдоль аксона.

ФСС при скрейпи, куру и БКЯ напоминают как парные спиральные филаменты, так и амилоидные волокна, хотя они и отличаются друг от друга [70, 147, 148, 151]. Снова возникает во-

прос: не являются ли амилоидные волокна и парные спиральные филаменты различной конфигурацией одного и того же макромолекулярного комплекса нейрофиламентов [107, 109], который и составляет ФСС? Прузинер показал, что «белок приона», агрегированный в «прионовые палочки», которые, видимо, идентичны ФСС Мерц, имеет сходное с амилоидом поведение при окрашивании и двойное лучепреломление. Бахманьяр с помощью иммунофлуоресценции обнаружил общие детерминанты у нормальных нейрофиламентов, НФС и скоплений нейрофиламентов у крыс, отравленных ИДПН. Мы можем задать вопрос: не связаны ли вирусы скрейпи, куру и БКЯ с синтезом нейрофиламентов и их транспортом. В этом случае было бы неудивительно, что они часто ведут к образованию НФС и амилоидных бляшек, а также то, что аутоиммунные антитела к (10-нм)-нейрофиламентам, которые они индуцируют, реагируют с НФС [12, 107, 109]. Вероятно, мы можем рассматривать продукцию нейрофиламентов как «гаммаглобулин» нейрона и считать эти неканонические вирусы подобными молекулам гаммаглобулина. Последние становятся антигенами и запускают свой собственный синтез в В-лимфоцитах за счет конфигурационных изменений, которые были индуцированы в них образованием иммунного комплекса. Неканонические вирусы, возможно, запускают продукцию в нейронах аномальных нейрофиламентов за счет нарушения копирования генома, вызванного белком-дерепрессором, подобным белку нейрофиламентов.

### Литература

1. Alper T., Crump W. A., Haig D. A., Clark M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without a nucleic acid? *Nature*, **241**, 764—767.
2. Alper T., Haig D. A., Clark M. C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent, *Biochem. Biophys. Commun.*, **22**, 278—284.
3. Alper T., Haig D. A., Clark M. C. (1978). The scrapie agent: evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid, *J. Gen. Virol.*, **41**, 503—516.
4. Alpers M. P. (1968). Kuru: implications of its transmissibility for the interpretation of its changing epidemiologic pattern, In: *The Central Nervous System*, pp. 234—251, International Academy of Pathology Monograph, No. 9, Baltimore.
5. Alpers M. P., Gajdusek D. C. (1965). Changing patterns of kuru: epidemiological changes in the period of increasing contact of the Fore people with Western civilization, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **14**, 852—879.
6. Alpers M. P., Gajdusek D. C., Ono S. G. (1975). Bibliography of Kuru, 3rd revision, National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda.
7. Andrews J. M., Gardner M. B. (1974). Lower motor neuron degeneration associated with type C RNA virus infection in mice: neuropathological features, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **33**, 285—307.
8. Aoki T., Gibbs C. J., Jr., Sotelo J., Gajdusek D. C. (1982). Heterogenic autoantibody against neurophilament protein in the sera of animals with



- experimental kuru and Creutzfeldt-Jacob disease and natural scrapie infection, *Infect. Immun.*, **38**, 316—324.
9. Asher D. M., Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1983). Familial spongiform encephalopathies, *Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. Res. Publ.*, **60**, 273—291.
10. Asher D. M., Yanagihara R. T., Rogers N. G., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1979). Studies of the viruses of spongiform encephalopathies in cell culture, In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Vol. 2, ed. by S. B. Prusiner and W. J. Hadlow, pp. 235—242, Academic Press, New York.
11. Bahmanyar S., Gajdusek D. C., Sotelo J., Gibbs C. J., Jr. (1982). Longitudinal spinal cord sections as substratum for anti-neurofilament antibody detection, *J. Neurol. Sci.*, **53**, 85—90.
12. Bahmanyar S., Liem R. K. H., Griffin J. W., Gajdusek D. C. (1984). Characterization of antineurofilament autoantibodies in Creutzfeldt-Jacob disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **43**, 369—375.
13. Bahmanyar S., Moreau-Dubois M. C., Brown P., Cathala F., Gajdusek D. C. (1983). Serum antibodies to neurofilament antigens in patients with neurological and other diseases and in healthy controls, *J. Neuroimmunol.*, **5**, 191—196.
14. Bahmanyar S., Williams E. S., Johnson F. B., Young S., Gajdusek D. C. (1984). Amyloid plaques in spongiform encephalopathy of mule deer, *J. Comp. Pathol.* (in press).
- 14a. Baringer J. R., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr., Masters C. L., Stern W. E., Terry R. D. (1980). Transmissible dementias: current problems in tissue handling, *Neurology (NY)*, **30**, 302—303.
15. Baringer J. R., Prusiner S. B. (1978). Experimental scrapie in mice, ultrastructural observations, *Ann. Neurol.*, **4**, 205—211.
16. Beck E., Daniel P. M., Alpers M., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1966). Experimental «kuru» in chimpanzees: a pathological report, *Lancet*, **2**, 1056—1059.
17. Beck E., Daniel P. M., Alpers M., Gajdusek D. C., Gibbs C. J. J., Hassler R. (1975). Experimental kuru in the spider monkey: Histopathological and ultrastructural studies of the brain during early states of incubation, *Brain*, **98**, 592—620.
18. Beck E., Daniel P. M., Davey A., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1982). The pathogenesis of spongiform encephalopathies: an ultrastructural study, *Brain*, **104**, 755—786.
19. Beck E., Daniel P. M., Gajdusek D. C. (1966). A comparison between the neuropathological changes in kuru and scrapie, a system degeneration. In: *Proceedings of the Fifth International of Neuropathology*, ed. by F. Luthy and A. Bischoff, pp. 213—218, International Congress Series, No. 100, Excerpta Medica, Amsterdam.
20. Beck E., Daniel P. M., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1973). Experimental kuru in the chimpanzee: a neuropathological study, *Brain*, **96**, 441—442.
21. Beck E., Daniel P. M., Matthews W. B., Stevens D. L., Alpers M. P., Asher D. M., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1969). Creutzfeldt-Jacob disease: the neuropathology of a transmission experiment, *Brain*, **92**, 699—716.
22. Beck E., Daniel P. M., Parry H. B. (1964). Degeneration of the cerebellum and hypothalamoneurohypophyseal system in sheep with scrapie, and its relationship to human degenerations, *Brain*, **87**, 153—176.
23. Bernoulli C., Siegfried J., Baumgartner G., Regli F., Rabinowicz T., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1977). Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery, *Lancet*, **1**, 478—479.
24. Besnoit C. (1899). La tremblante ou nevrite peripherique enzootique du mouton, *Rev. Vet. Toulouse*, **24**, 265—277, 333—343.

- 24a. Bockman J. M., Kingsbury D. T., McKinley M. P., Bendheim P. E., Prusiner S. B. (1985). Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins in human brains, *N. Engl. J. Med.*, **312**, 73—78.
25. Bolton D. C., McKinley M. P., Prusiner S. B. (1984). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion, *Science*, **218**, 1309—1311.
26. Borras T., Gibbs C. J., Jr. (1985). Molecular hybridization studies of scrapie brain nucleic acids. I. Search for specific DNA sequences, *Arch. Virol.* (in press).
27. Borras M. T., Kingsbury D. T., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1982). Inability to transmit scrapie by transfection of mouse embryo cells in vitro, *J. Gen. Virol.*, **58**, 263—271.
27. Brooks B. R., Swarz J. R., Johnson R. T. (1980). Spongiform poliоencephalopathy caused by a murine retrovirus. I. Pathogenesis of infection in newborn mice, *Lab. Invest.*, **43**, 480—486.
29. Brooks B. R., Swarz J. R., Narayan O., Johnson R. T. (1979). Murine neurotropic retrovirus spongiform poliоencephalopathy: acceleration of disease by virus inoculum concentration, *Infect. Immun.*, **23**, 540—544.
30. Brown P. (1984). Biologic and chemotherapeutic forays into the field of unconventional viruses. In: *Targets for the Design of Antiviral Agents*, ed. by E. De Clerq and R. T. Walker, pp. 131—137. (Proceedings of NATO Advanced Study Institute, 19 June-2 July 1983, Les Arcs, France), Plenum, New York.
31. Brown P., Cathala F., Sadowsky D. (1983). Correlation between population density and the frequency of Creutzfeldt-Jakob disease in France, *J. Neurol. Sci.*, **60**, 169—176.
32. Brown P., Cathala F., Sadowsky D., Gajdusek D. C. (1979). Creutzfeldt-Jakob disease in France: clinical characteristics of 124 consecutive verified cases during the decade 1968—1977, *Ann. Neurol.*, **6**, 430—437.
33. Brown P., Gibbs C. J., Jr., Amyx H. L., Kingsbury D. T., Rohwer R. G., Sulima M. P., Gajdusek D. C. (1982). Chemical disinfection of Creutzfeldt-Jakob disease virus, *N. Engl. J. Med.*, **306**, 1279—1282.
34. Brown P., Rodgers-Johnson P., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1984). Creutzfeldt-Jakob disease of long duration: clinical-pathological characteristics, transmissibility, and differential diagnosis, *Ann. Neurol.*, **16**, 295—304.
35. Brown P., Rohwer R. G., Gajdusek D. C. (1984). Sodium hydroxide decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease virus, *N. Engl. J. Med.* (letter to the editor), **310**, 11 (March 15), 727.
36. Brown P., Rohwer R. G., Green E. M., Gajdusek D. C. (1982). Effect of chemicals, heat and histopathological processing of high infectivity hamster-adapted scrapie virus, *J. Infect. Dis.*, **145**, 5, 683—687.
37. Brown P., Salazar A. M., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1982). Alzheimer disease and transmissible virus dementia (CJD), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **396**, 131—143.
38. Bruce M. E., Fraser H. (1981). Effect of rate of infection on the frequency and distribution of cerebral amyloid plaques in scrapie mice, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **1**, 289—298.
39. Cathala F., Brown P., Raharison S., Chatelain J., Lecanuet P., Castaigne P., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1982). Maladie de Creutzfeldt-Jakob en France: contribution à une recherche épidémiologique *Rev. Neurol. (Paris)*, **138**, 39—51.
40. Cauvet (1854). Sur la tremblante, *J. Vet. Midi.*, **7**, 441—448.
41. Chandler R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced with scrapie brain material, *Lancet*, **1**, 1378—1379.
42. Chandler R. L. (1963). Experimental scrapie in the mouse, *Rev. Vet. Sci.*, **4**, 276—285.

43. Court L., Cathala F., eds. (1983). *Virus Non Conventionnels et Affections du Système Nerveux Central*, Masson, Paris.
44. Cuillé J., Chelle P. L. (1936). Pathologie animal — la maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? C. R. Acad. Sci. [D] (Paris), 203, 1552—1554.
45. Dahl D., Bignami A. (1978). Immunochemical cross-reactivity of normal neurofibrils and aluminum-induced neurofibrillary tangles: immunofluorescence study with antineurofilament serum, *Exp. Neurol.*, 58, 74—80.
46. Dickinson A. C., Fraser H. (1977). Scrapie: pathogenesis in inbred mice: an assessment of host control and response involving many strains of agent. In: *Slow Virus Infections of the Central Nervous System*, ed. by V. ter Meulen and M. Katz, pp. 3—14, Springer-Verlag, New York.
47. Dickinson A. G., Fraser H., Bruce M. (1971). Animal models for the dementias. In: *Alzheimer's Disease*, ed. by Glen and Whaley, Churchill Livingstone, Edinburgh.
48. Dickinson A. C., Fraser H., Outram G. W. (1976). Scrapie incubation time can exceed natural lifespan, *Nature*, 256, 732—733.
49. Diener T. O. (1972). Is the scrapie agent a viroid? *Nature*, 235, 218.
50. Diener T. O. (1973). Similarities between the scrapie agent and the agent of potato spindle tuber disease, *Ann. Clin. Res.*, 5, 268—278.
51. Diener T. O. (1979). Viroids: structure and function, *Science*, 205, 859—866.
52. Diener T. O. (1979). *Viroids and Viroid Disease*, Wiley, New York.
53. Diringer H., Gelderblom H., Hilmert H., Ozel M., Edelbluth C., Kimberlin R. H. (1983). Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein, *Nature*, 306, 471—478.
54. Dubois-Dalcq M., Rodriguez M., Reese T. S., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1977). Search for a specific marker in the neural membranes of scrapie mice (a freeze-fracture study), *Lab. Invest.*, 36, 547—553.
55. Duffy P., Wolf J., Collins G., DeVoe A. G., Steeten B., Cowen D. (1974). Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease, *N. Engl. J. Med.*, 299, 692—693.
56. Eklund C. M., Kennedy R. C., Hadlow W. J. (1967). Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse, *J. Infect. Dis.*, 117, 15—22.
57. Farquhar J., Gajdusek D. C., eds. (1980). *Kuru: Early Letters and Field Notes from the Collection of D. Carleton Gajdusek*, Raven Press, New York.
58. Foncin J., Gaches J., Cathala F., El Sharif E., Le Beau J. (1980). Transmission iatrogène interhumaine possible de maladie de Creutzfeldt-Jakob avec atteinte des grains du cervelet, *Rev. Neurol. (Paris)*, 136, 280.
59. Fukatsu R., Amyx H. L., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1984). Amyloid plaque formation along the needle tracts in experimental murine scrapie. (Abstract number 62 in Abstracts of the 60th Annual Meeting of the American Association of Neuropathologists, June 14—17, San Diego.) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 43, 3 (May), 313.
60. Gajdusek D. C. (1963). Motor-neuron disease in natives of New Guinea, *N. Engl. J. Med.*, 268, 474—476.
61. Gajdusek D. C. (1963). Kuru, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 57, 151—169.
62. Gajdusek D. C. (1972). Spongiform virus encephalopathies, *J. Clin. Pathol. [Suppl.]*, 25, 78—83.
63. Gajdusek D. C. (1973). Kuru in the New Guinea highlands. In: *Tropical Neurology*, ed. by J. D. Spillane, pp. 376—383, Oxford Press, New York.
64. Gajdusek D. C., ed. (1976). Correspondence on the Discovery and Original Investigations of Kuru. Smadel-Gajdusek Correspondence 1956—1959, National Institute of Health, Bethesda.
65. Gajdusek D. C. (1977). Urgent opportunistic observations: the study of changing, transient and disappearing phenomena of medical interest in dis-



- rupted primitive human communities. In: *Health and Disease in Isolated and Tribal Societies*, ed. by J. Whelan, pp. 69—102, Ciba Foundation Monograph, 49, Excerpta Medica Foundation, North Holland.
66. *Gajdusek D. C.* (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, **197**, 943—960.
  67. *Gajdusek D. C.* (1978). Slow infections with unconventional viruses, *Harvey Lect.*, **72**, 283—353.
  68. *Gajdusek D. C.* (1979). A focus of high incidence amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism and dementia syndromes in a small population of Auyu and Jakai peoples of southern West New Guinea. In: *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, ed. by T. Tsubaki and Y. Toykura, pp. 287—305, University of Tokyo Press, Tokyo.
  69. *Gajdusek D. C.* (1959—1983). *Journals 1954—1983*, 34 volumes, published in limited edition, National Institutes of Health, Bethesda.
  70. *Gajdusek D. C.* (1985). Subacute spongiform virus encephalopathies caused by unconventional viruses. In: *Subviral Pathogens of Plants and Animals: Viroids and Prions*, ed. by K. Maramorosh and J. McKelvey Jr., pp. 483—544, Academic Press, New York.
  71. *Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr.* (1971). Transmission of the two subacute spongiform encephalopathies of man (kuru and Creutzfeldt-Jakob disease) to New World monkeys. *Nature*, **230**, 588—591.
  72. *Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr.* (1973). Subacute and chronic diseases caused by atypical infections with unconventional viruses in aberrant hosts, *Perspect. Virol.*, **8**, 279—311.
  73. *Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr.* (1975). Slow virus infections of the nervous system and the laboratories of slow, latent and temperate virus infections. In: *The Nervous System*, ed. by D. B. Tower, Vol. 2: *The Clinical Neurosciences*, ed. by T. N. Chase, pp. 113—135, Raven Press, New York.
  74. *Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr., Alpers M., eds.* (1965). *Slow, Latent and Temperate Virus Infections*, NINDB Monograph No. 2, National Institutes of Health, PHS Publication No. 1378, U. S. Government Printing Office, Washington, D. C.
  75. *Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr., Alpers M.* (1966). Experimental transmission of a kuru-like syndrome in chimpanzees, *Nature*, **209**, 794—796.
  76. *Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr., Alpers M. P.* (1967). Transmission and passage of experimental «kuru» to chimpanzees, *Science*, **155**, 212—214.
  77. *Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr., Asher D. M., Brown P., Diwan A., Hofjman P., Nemo G., Rohwer R., White L.* (1977). Precautions in medical care of, and in handling of materials from, patients with transmissible virus dementia (Creutzfeldt-Jakob disease), *N. Engl. J. Med.*, **297**, 1253—1258.
  78. *Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr., Collins G., Traub R.* (1976). Survival of CJ disease virus in formolfixed brain tissue, *N. Engl. J. Med.*, **294**, 553.
  79. *Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr., Rogers N. G., Basnight M., Hooks J.* (1972). Persistence of the viruses of kuru and Creutzfeldt-Jakob disease in tissue cultures of brain cells, *Nature*, **235**, 104—105.
  80. *Gajdusek D. C., Zigas V.* (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea: The endemic occurrence of «kuru» in the native population, *N. Engl. J. Med.*, **257**, 974—978.
  81. *Gajdusek D. C., Zigas V.* (1959). Kuru: clinical pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the Eastern Highlands of New Guinea, *Am. J. Med.*, **26**, 442—469.
  82. *Galvez S., Cartier L.* (1979). A new familial clustering of Creutzfeldt-Jakob disease in Chile, *Neurochirurgia*, **37**, 58—65.
  83. *Gambetti P., Shocket G., Ghetti B., Hirano A., Dahl D.* (1983). Neurofibrillary changes in human brain: an immunocytochemical study with a neurofilament antiserum, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **42**, 69—79.

84. Gardner M. B., Henderson B. E., Officer J. E., Ronge R. W., Parker J. C., Oliver C., Estes J. D., Huebner R. J. (1973). A spontaneous lower motor neuron disease apparently caused by indigenous type C RNA virus of wild mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1243—1254.
85. Garruto R., Fukatsu R., Yanagihara R., Gajdusek D. C., Hook G., Fiori C. E. (1984). Imaging of calcium and aluminum in neurofibrillary tangle-bearing neurons in parkinsonism-dementia of Guam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6 (March), 875—879.
86. Gibbs C. J., Jr., Amyx H. L., Bacote A., Masters C., Gajdusek D. C. (1980). Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates, *J. Infect. Dis.*, **142**, 205—208.
87. Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1972). Transmission of scrapie to the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), *Nature*, **236**, 73—74.
88. Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C., Amyx H. (1979). Strain variation in the viruses of Creutzfeldt-Jakob disease and kuru. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Vol. 2, ed. by S. B. Prusiner and W. J. Hadlow, pp. 87—110, Academic Press, New York.
89. Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C., Asher D. M., Alpers M. P., Beck E., Daniel P. M., Matthews W. B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (subacute spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee, *Science*, **161**, 388—389.
90. Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C., Latarjet R. (1978). Unusual resistance to UV and ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie (unconventional viruses), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 6268—6270.
91. Gibbs C. J., Jr., Masters C. L., Gajdusek D. C. (1979). Bibliography of Creutzfeldt-Jakob Disease, Publication No. 79-1952, National Institute of Health, Bethesda.
92. Glass R. M. (1963). Cannibalism in the Kuru Region, Department of Public Health, Papua, New Guinea.
- 92a. Goldberg H., Alter M., Kahana E. (1979). The Libyan Jewish focus of Creutzfeldt-Jakob disease: a search for the mode of natural transmission. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Vol. 1, ed. by S. B. Prusiner and W. J. Hadlow, pp. 451—460, Academic Press, New York.
93. Goudsmit J., Morrow C. H., Asher D. M., Yanagihara R. T., Mastera C. L., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1980). Evidence for and against the transmissibility of Alzheimer's disease, *Neurology (NY)*, **30**, 945—950.
94. Goudsmit J., Rohwer R. G., Silbergeld E. K., Nechers L. M., Gajdusek D. C. (1983). Scrapie in hamsters: clinical disease and disturbances in the serotonergic pathway. In: *Virus Non Conventionnels et Affections du Système Nerveux Central*, ed. by L. Court and F. Cathala, pp. 453—463, Masson, Paris.
95. Gourmelon P., Amyx H. L., Breton P., Court L., Gibbs C. L., Jr. (1983). Altération du sommeil paradoxal dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob expérimentale du chat. In: *Virus Non Conventionnels et Affections du Système Nerveux Central*, ed. by L. Court and F. Cathala, pp. 363—371, Masson, Paris.
96. Gourmelon P., Bassant M. H., Dormont D., Court L., Gibbs C. J., Jr. (1983). Modifications électroencéphalographiques dans la tremblante expérimentale de la souris et du hamster. In: *Virus Non Conventionnels et Affections du Système Nerveux Central*, ed. by L. Court and F. Cathala, pp. 372—387, Masson, Paris.
97. Hadlow W. J. (1959). Scrapie and kuru, *Lancet*, **2**, 289—290.
98. Hadlow W. J., Eklund C. M., Kennedy R. C., Jackson T. A., Whitford H. W., Boyle C. C. (1974). Course of experimental scrapie virus infection in the goat, *J. Infect. Dis.*, **129**, 559—567.

99. *Hadlow W. J., Race R. E., Kennedy C., Eklund C. M.* (1979). Natural infection of sheep with scrapie virus. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Vol. 2, ed. by S. B. Prusiner and W. J. Hadlow, pp. 3—12, Academic Press, New York.
100. *Haig D. C., Clarke M. C., Blum E., Alper T.* (1969). Further studies on the activation of the scrapie agent by ultraviolet light, *J. Gen. Virol.*, 5, 455—457.
101. *Hartsough G. R., Burger D.* (1965). Encephalopathy in mink. 1. Epizootological and clinical observations, *J. Infect. Dis.*, 115, 387—392.
102. *Herzberg L., Herzberg B. N., Gibbs C. J., Jr., Sullivan W., Amyx H., Gajdusek D. C.* (1974). Creutzfeldt-Jakob disease: hypothesis for high incidence in Libyan Jews in Israel, *Science*, 186, 848.
103. *Hirano A., Inoue K.* (1980). [Early pathological changes in amyotrophic lateral sclerosis: electron microscopic study of chromatolysis, spheroids, and Bunina bodies.] *Neurol Med. (Tokyo)*, 13, 148—160.
104. *Hornabrook R. W., Wagner F.* (1975). Creutzfeldt-Jakob disease, *Papua New Guinea Med. J.*, 18, 226—228.
105. *Hunter G. D., Collis S. C., Millson G. C., Kimberlin R. H.* (1976). Search for scrapie-specific RNA and attempts to detect an infectious DNA or RNA, *J. Gen. Virol.*, 32, 157—162.
106. *Hunter G. D., Millson G. C.* (1977). The scrapie agent — the present position about its nature, *Recent Adv. Clin. Virol.*, 1, 61—77.
107. *Uhara Y., Nukina N., Sugita H., Toyokura Y.* (1981). Staining of Alzheimer's neurofibrillary tangles with antiserum against 200K component of neurofilament, *Proc. Jpn. Acad.*, 57, 152—156.
108. *Inoue K., Hirano A.* (1979). [Early pathological changes in amyotrophic lateral sclerosis: autopsy findings of a case of ten months' duration.] *Neurol. Med. (Tokyo)*, 11, 448—455.
109. *Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Wisniewski H. M., Terry R. D.* (1978). Clinical relationship of the paired helical filaments of Alzheimer's dementia to normal human neurofilaments and neurotangles, *Brain Res.*, 142, 321—332.
110. *Jellinger V. K., Seitelberger F., Heiss W. D., Holczabek W.* (1972). Konjugale Form der subakuten spongiosen Enzephalographie (Jakob-Creutzfeldt-Etkroukung), *Wien Klin. Wochenschr.*, 84, 245—249.
111. *Kahana E., Alter M., Barham J., Sofer D.* (1974). Creutzfeldt-Jakob disease: focus among Libyan Jews in Israel, *Science*, 183, 90—91.
112. *Kamin M., Patten B. M.* (1984). Hypothesis: Creutzfeldt-Jakob disease — transmission to man by eating brains of wild animals, *Am. J. Med.*, 76, 142—145.
113. *Kaspar K. C., Stites D. P., Bowman K. A., Panitoh H., Prusiner S.* (1982). Immunological studies of scrapie infection, *J. Neuroimmunol.*, 3, 187—201.
114. *Kimberlin R. H., Marsh R. F.* (1975). Comparison of scrapie and transmissible milk encephalopathy in hamsters. I. Biochemical studies of brain during development of disease, *J. Infect. Dis.*, 131, 97—103.
115. *Kimberlin R. H., Walker C. A.* (1980). Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS, *J. Gen. Virol.*, 51, 183—187.
116. *Kingsbury D. T., Amyx H. L., Gibbs C. J., Jr.* (1983). Biophysical properties of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. In: *Virus Conventiionnels et Affections du Système Nerveux Central*, ed. by L. Court and F. Cathala, pp. 125—137, Masson, Paris.
117. *Kingsbury D. T., Kaspar K. C., Stites D. P., Watson J. D., Hogan R., Prusiner S.* (1981). Genetic control of scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease in mice, *J. Immunol.*, 131, 491—496.
118. *Kingsbury D. T., Smeltzer D. A., Gibbs C. J., Gajdusek D. C.* (1981). Evidence for normal cell mediated immunity in scrapie infected mice, *Infect. Immun.*, 32, 1176—1180.



119. *Kingsbury D. T., Watson J. D.* (1983). Genetic control of the incubation time of mice infected with a human agent of spongiform encephalopathy. In: *Virus Non Conventionnels et Affections du Système Nerveux Central*, ed. by L. Court and F. Cathala, pp. 138—144, Masson, Paris.
120. *Kirschbaum W.* (1968). *Jakob-Creutzfeldt Disease*, Elsevier, New York.
121. *Klatzo I., Gajdusek D. C., Zigas V.* (1959). Pathology of kuru, *Lab. Invest.*, **8**, 799—847.
122. *Klitzman R. L., Alpers M. P., Gajdusek D. C.* (1985). The natural incubation period of kuru and the episodes of transmission in three clusters of patients, *Neuroepidemiology*, **3**.
123. *Kuroda Y., Gibbs C. J., Jr., Amyx H. L., Gajdusek D. C.* (1983). Creutzfeldt-Jakob disease in mice: persistent viremia and preferential replication of virus in low-density lymphocytes, *Infect. Immunol.*, **41**, 154—161.
124. *Lampert P. W., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr.* (1972). Subacute spongiform virus encephalopathies: scrapie, kuru and Creutzfeldt-Jakob disease, *Ann. J. Pathol.*, **68**, 626—646.
125. *Lampert P. W., Hooks J., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C.* (1971). Altered plasma membranes in experimental scrapie, *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **19**, 80—93.
126. *Landis D. M. D., Williams R. S., Masters C. L.* (1981). Golgi and electron microscopic studies of spongiform encephalopathy, *Neurology (NY)*, **31**, 538—549.
127. *Latarjet R.* (1979). Inactivation of the agents of scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease and kuru by radiation. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Vol. 2, ed. by S. B. Prusiner and W. J. Hadlow, pp. 387—407, Academic Press, New York.
128. *Latarjet R., Muel B., Haig D. A., Clarke M. C., Alper T.* (1970). Inactivation of the scrapie agent by near-monochromatic ultraviolet light, *Nature*, **227**, 1341—1343.
129. *Lindenbaum S.* (1979). *Kuru Sorcery*, Mayfield, Palo Alto, California.
130. *Malone T. G., Marsh R. F., Hanson R. P., Semancik J. S.* (1979). Evidence for the low molecular weight nature of the scrapie agent, *Nature*, **278**, 575—576.
131. *Manuelidis E. E.* (1975). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from man to the guinea pig, *Science*, **190**, 571—572.
132. *Manuelidis E. E., Angelo J. N., Gorgacz E. J., Manuelidis L.* (1977). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to Syrian hamster, *Lancet*, **1**, 479.
133. *Manuelidis E. E., Kim J., Angelo J. N., Manuelidis L.* (1976). Serial propagation of Creutzfeldt-Jakob disease in guinea pigs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 223—227.
134. *Marotta C. A. ed.* (1983). *Neurofilaments* University of Minnesota Press, Minneapolis.
- 134a. *Marsh R. F., Hanson R. P.* (1979). On the origin of transmissible milk encephalopathy. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Vol. 1, ed. by S. B. Prusiner and W. J. Hadlow, pp. 451—460, Academic Press, New York.
135. *Marsh R. F., Kimberlin R. H.* (1975). Comparison of scrapie and transmissible milk encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology, and pathogenesis, *J. Infect. Dis.*, **131**, 104—110.
136. *Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr.* (1981). The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease, *Brain*, **104**, 535—558.
137. *Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr.* (1981). Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Sträussler syndrome, with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies, *Brain*, **104**, 559—588.

138. Masters C. L., Harris J. O., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr., Bernoulli C., Asher D. M. (1979). Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering, *Ann. Neurol.*, **5**, 177—188.
139. Masters C. L., Richardson E. P., Jr. (1978). Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease): the nature and progression of spongiform change, *Brain*, **101**, 333—344.
130. Matthews W. B. (1975). Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in England and Wales, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **38**, 210—213.
141. Mayer W., Orolin D., Mitrova E. (1977). Cluster of Creutzfeldt-Jakob disease and presenile dementia, *Lancet*, **2**, 256.
142. Mayer V., Orolin D., Mitrova E., Lehotsky Y. (1978). Transmissible virus dementia: an unusual space and time clustering of Creutzfeldt-Jakob disease and other organic presenile dementia cases, *Acta Virol. (Praha)*, **22**, 146—153.
143. McFarlin D. A., Raff M. C., Simpson E., Nehisen S. (1971). Scrapie in immunologically deficient mice, *Nature*, **233**, 336.
144. McKinley M. P., Bolton D. C., Prusiner S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion, *Cell*, **35**, 57—62.
145. McKinley M. P., Masiarz F. R., Isaacs S. T., Hearst J. E., Prusiner S. B. (1983). Resistance of the scrapie agent to inactivation by psoralens, *Photochem. Photobiol.*, **37**, 539—545.
146. McKinley M. P., Masiarz F. R., Prusiner S. B. (1981). Reversible chemical modification of the scrapie agent, *Science*, **214**, 1259—1261.
147. Merz P. A., Rohwer R. Q., Kascsak R., Wisniewski H. M., Somerville R. A., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1984). An infection specific particle from the unconventional slow virus diseases, *Science*, **225**, 4660 (July 27), 437—440.
148. Merz P. A., Rohwer R. G., Somerville R. A., Wisniewski H. M., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1983). Scrapie associated fibrils in human C Creutzfeldt-Jakob disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **42**, 327.
149. Merz P. A., Somerville R. A., Wisniewski H. M. (1983). Abnormal fibrils in scrapie and senile dementia of Alzheimer's type. In: *Virus Non Conventions et Affections du Système Nerveux Central*, ed. by L. A. Court and F. Cathala, pp. 259—281, Masson, Paris.
150. Merz P. A., Somerville R. A., Wisniewski H. M., Iqbal K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie infected brain, *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **54**, 63—74.
151. Merz P. A., Somerville R. A., Wisniewski H. M., Manuelidis L., Manuelidis E. E. (1983). Scrapie associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease, *Nature*, **306**, 474—476.
152. Mitrová E., Mayer V. (1977). Neurohistology of early preclinical lesions in experimental subacute spongiform encephalopathy, *Biológia (Bratislava)*, **32**, 663—671.
153. Moreau-Dubois M.-C., Brown P., Rohwer R. G., Masters C. L., Franco M., Gajdusek D. C. (1982). Experimental scrapie in the golden Syrian hamster: temporal comparison of in vitro cell fusing activity with brain infectivity and histopathologic changes, *Infect. Immun.*, **37**, 195—199.
154. Moreau-Dubois M.-C., Brown P., Gajdusek D. C. (1983). La fusion cellulaire dans l'étude des encéphalopathies spongiformes. In: *Virus Non Conventions et Affections du Système Nerveux Central*, ed. by L. Court and F. Cathala, pp. 164—173, Masson, Paris.
155. Morris J. A., Gajdusek D. C. (1963). Encephalopathy in mice following inoculation of scrapie sheep brain, *Nature*, **197**, 1084—1086.
156. Neugut R. H., Neugut A. I., Kahana E., Stein Z., Alter M. (1979). Creutzfeldt-Jakob disease: familial clustering among Libyan-born Israelis, *Neurology (NY)*, **29**, 225—231.

157. *Nevin S., McMenemy W. H., Behrman D., Jones D. P.* (1960). Subacute spongiform encephalopathy: a subacute form of encephalopathy attributable to vascular dysfunction (spongiform cerebral atrophy), *Brain*, **83**, 519.
158. *Pattison T. H., Hoare M. N., Jebbett J. N., Watson W. A.* (1972). Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with fetal membranes from scrapie affected sheep, *Vet. Rec.*, **99**, 465—467.
159. *Perl D., Gajdusek D. C., Garruto R. M., Yanagihara R. T., Gibbs C. J., Jr.* (1982). Intraneuronal aluminum accumulation in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam, *Science*, **217**, 1053—1055.
160. *Prusiner S. B.* (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, *Science*, **216**, 136—144.
161. *Prusiner S. B., Bolton D. C., Groth D. F., Bowman K. A., Cochran S. P., McKinley M. P.* (1982). Further purification and characterization of scrapie prions, *Biochemistry*, **21**, 6942—6950.
162. *Prusiner B., Hadlow W. J., eds.* (1979). *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Vols. 1 and 2, Academic Press, New York.
163. *Prusiner S. B., McKinley M. P., Bowman K. A., Bolton D. C., Bendheim P. D., Groth D. F., Glenner G. G.* (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringens rods, *Cell*, **35**, 349—358.
164. *Prusiner S. B., McKinley M. P., Groth D. F., Bowman K. A., Mock N. L., Cochran S. P., Masiarz F. R.* (1981). Scrapie agent contains a hydrophobic protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6675—6679.
165. *Raine C. S., Field E. J.* (1967). Oriented tubules in axoplasm of cerebellar myelinated nerve fibers in the rat: a study of normal and scrapie animals, *Acta Neuropathol.* (Wien), **9**, 298—304.
166. *Rohwer R. G.* (1983). Scrapie inactivation kinetics: an explanation for scrapie's apparent resistance to inactivation, a reevaluation of estimates of its small size, In: *Virus Non Conventionnels et Affections du Système Nerveux Central*, ed. by L. Court and F. Cathala, pp. 84—113, Masson, Paris.
167. *Rohwer R. G.* (1985). Growth kinetics of hamster scrapie strain 263K: sources of slowness in a slow virus infection, *Virology* (in press).
168. *Rohwer R. G.* (1984). Scrapie infectious agent is virus-like in size and susceptibility to inactivation, *Nature*, **308**, 5960 (April 12), 658—662.
169. *Rohwer R. G.* (1984). Virus-like sensitivity of scrapie agent to heat inactivation, *Science*, **223**, 4636 (February 16), 600—602.
170. *Rohwer R. G., Gajdusek D. C.* (1980). Scrapie—virus or viroid: the case for a virus. In: *Search for the Cause of Multiple Sclerosis and Other Chronic Diseases of the Central Nervous System*, ed. by A. Boese, pp. 333—355, Verlag Chemie, Weinheim.
171. *Roos R., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr.* (1973). The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease, *Brain*, **96**, 1—20.
172. *Salazar A. M., Brown P., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr.* (1983). Alzheimer's disease: relation to Creutzfeldt-Jakob disease and other unconventional virus diseases. In: *Alzheimer's Disease. The Standart Reference*, ed. by B. Reisberg, pp. 311—318, The Free Press, Macmillan, New York.
173. *Salazar A. M., Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr.* (1983). Syndromes of amyotrophic lateral sclerosis and dementia: relation to transmissible Creutzfeldt-Jakob disease, *Ann. Neurol.*, **14**, 17—26.
174. *Sanger H. L.* (1982). Biology, structure, functions, and possible origins of plant viroids. In: *Encyclopaedia of Plant Pathology*, Voll. II; *Nucleic Acids and Proteins in Plants*, New Series, **14B**, pp. 368—454, Springer-Verlag.
175. *Scheler A.* (1863). Études sur la constance, *Ann. Med. Vet.*, **12**, 113—137.
176. *Schleg* (1890). Traberkrankheit, *Jahresbericht Leistungen Geb. Vet. Med.*, **9**, 92.
177. *Schmalz* (1827). Observations relatives au rapport de M. Lezius, sur le vertige des moutons, *Bull. Sci. Agric. Econom.*, **7**, 217—219.



178. Siakotos A. N., Bucana C., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr., Traub R. D. (1976). Partial purification of the scrapie agent from mouse brain by pressure disruption and zonal centrifugation in a sucrose-sodium chloride gradient, *Virology*, **70**, 230—237.
179. Sigurdsson B. (1954). Rida, a chronic encephalitis of sheep: with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics, *Br. Vet. J.*, **110**, 341—354.
180. Sotelo J., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1980). Autoantibodies against axonal neurofilaments in patients with kuru and Creutzfeldt-Jakob disease, *Science*, **210**, 190—193.
181. Sotelo J., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C. (1984). Control neurons in culture in the study of spongiform encephalopathies, *Adv. Cell. Neurobiol.*, **5**, 251.
182. Sotelo J., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C., Toh B. H., Wurth M. (1980). Method for preparing cultures of central neurons: cytochemical and immunochemical studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 653—657.
183. Tateishi J., Ohta M., Koga M., Sato Y., Kuriowa Y. (1979). Transmission of chronic spongiform encephalopathy with kuru plaques from humans to small rodents, *Ann. Neurol.*, **5**, 581—584.
184. Tateishi J., Sato Y., Ohta M. (1983). Creutzfeldt-Jakob disease in humans and laboratory animals. In: *Progress in Neuropathology*, Vol. 5, ed. by H. M. Zimmerman, pp. 195—221, Raven Press, New York.
- 184a. Toh B. H., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C., Goudsmit J., Dahl D. (1985). 200,000/150,000 dalton neurofilament proteins react with IgG autoantibodies from patients with kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and other neurologic diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press).
- 184b. Toh B. H., Gibbs C. J., Jr., Gajdusek D. C., Tuthill D. P., Dahl D. (1985). 200,000/150,000 dalton neurofilament proteins react with IgG autoantibodies from chimpanzees with kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and 62,000 dalton neurofilament proteins react with sera from sheep with natural scrapie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press).
185. Traub R. D., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1974). Precautions in conducting biopsies and autopsies on patients with presenile dementia, *J. Neurosurg.*, **41**, 394—395.
186. Traub R. D., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1975). Precautions in autopsies on Creutzfeldt-Jakob disease, *Am. J. Clin. Pathol.*, **64**, 417.
187. Traub R., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr. (1977). Transmissible virus dementia: the relation of transmissible spongiform encephalopathy to Creutzfeldt-Jakob disease. In: *Aging and Dementia*, ed. by M. Kingsbourne and L. Smith, pp. 91—172, Spectrum, New York.
188. Ward R. L., Porter D. D., Stevens J. G. (1974). Nature of the scrapie agent: evidence against a viroid, *J. Virol.*, **14**, 1099—1103.
189. Will R. G., Matthews W. B. (1982). Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **45**, 235.
190. Williams E. S., Young S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy, *J. Wildl. Dis.*, **16**, 89—98.
191. Williams E. S., Young S. (1982). Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk, *J. Wildl. Dis.*, **18**, 465—471.
192. Williams E. S., Young S., Marsh R. F. (1982). Preliminary evidence of the transmissibility of chronic wasting disease of mule deer, In: *Proceedings of the Wildlife Disease Association Annual Conference*, August 19, 1982, Madison, Wisconsin, Abstract No. 22.
193. Worthington M., Clark R. (1971). Lack of effect of immunosuppression on scrapie infection in mice, *J. Gen. Virol.*, **13**, 349—351.
194. Zigas V., Gajdusek D. C. (1957). Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea, *Med. J. Aust.*, **2**, 745—754.
195. Zlotnik I. (1962). The pathology of scrapie: a comparative study of lesions in the brain of sheep and goats, *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **1**, 61—70.

## Список сокращений

AAV	адено-ассоциированные вирусы
ДНК-Б	комплекс ДНК-белок
ИДПН	$\beta, \beta$ -иминодипропионитрил
К	килодалтоны (тысячи дальтон)
П	пропердин
ПСПЭ	подострый склерозирующий панэнцефалит
РФ	репликативная форма
СМЖ	спинномозговая жидкость
ТКИД <sub>50</sub>	тканевая культуральная инфекционная доза
ТКФР	Т-клеточный фактор роста, или интерлейкин-2
ТЛВ	Т-лейкоз/лимфома взрослых
ФГА-Р	фитогемагглютинин Р
ФСС	фибриллы, связанные со скреппи
ЦПЭ	цитопатический эффект
ШЭР	шероховатый эндоплазматический ретикулум
ЭР	эндоплазматический ретикулум
ЯЭ	ядерный экстракт
Ad2	аденовирус типа 2
BCV	коронавирус крупного рогатого скота
BLV	вирус лейкоза крупного рогатого скота
bp	пары оснований (от англ. base pairs)
CCV	вирус кошачьего сомика
CMV	цитомегаловирус
DBP	ДНК-связывающий белок (от англ. DNA-binding protein)
EHV	герпесвирус лошадей типа 1
EBV	вирус Эпштейна — Барр
FECV	кишечный коронавирус кошек
FIPV	вирус инфекционного перитонита кошек
HCV	респираторный коронавирус человека
HECV	кишечный коронавирус человека
HEV	гемагглютинирующий вирус энцефаломиелита свиней
HSV-1	вирус простого герпеса типа 1
HSV-2	вирус простого герпеса типа 2
HTLV	вирусы Т-лейкоза человека

IBV	вирус инфекционного бронхита птиц
kb	килобазы (тысячи оснований)
LAV	вирус лимфаденопатии
MDV	герпесвирус болезни Марека
MHV	вирус гепатита мышей
PSV	вирус псевдобешенства
RbCV	коронавирус кроликов
TCV	коронавирус индюков
TGEV	вирус инфекционного гастроэнтерита свиней
TP	концевой белок (от англ. terminal protein)
VZV	вирус ветряной оспы/опоясывающего лишая



## Указатель латинских названий

- Adenoviridae* I: 23, 26, 31  
*Aedes aegypti* I: 265, 271  
 — *triseriatus* I: 272, 379, 380, 381, 382, 383  
*Akodon azarae* II: 393  
*Alphaherpesvirinae* I: 29; III: 189  
*Alphavirus* I: 38, 39, 40  
*Amsacta moori* III: 247  
*Anas domestica* I: 24  
*Anser domesticus* I: 24  
*Aphthovirus* I: 50, 51; II: 191, 192  
*Apodemus agarius corea* II: 392  
*Arenaviridae* I: 26, 47; II: 366  
*Arenavirus* I: 47, 48  
*Artibeus jamaicensis* II: 393  
 — *literatus* II: 393  
*Ateles* sp. III: 408  
*Autographa californica* II: 73  
*Aviadenovirus* I: 23, 24, 32; III: 112  
*Avipoxvirus* I: 26, 28; III: 247
- Betaherpesvirinae* I: 30; III: 189  
*Birnaviridae* I: 26, 38  
*Bos taurus* I: 24  
*Brucella abortus* II: 51  
*Bunyaviridae* I: 26, 46; II: 366, 367, 368, 384  
*Bunyavirus* I: 46, 47; II: 366, 367, 368, 371, 372
- Caliciviridae* I: 26, 51  
*Calicivirus* I: 51, 52  
*Callosciurus erythracus* I: 34  
*Calomys callosus* II: 393  
 — *laucha* II: 393  
 — *musculus* II: 393  
*Canis familiaris* I: 24  
*Capra hircus* I: 24  
*Capripoxvirus* I: 27, 28; III: 247  
*Cardiovirus* I: 50, 51; II: 191, 192  
*Cebus* sp. III: 408  
*Cercopithecus* II: 268
- Chironomus luridus* III: 247  
*Chloriridovirus* I: 28  
*Chordopoxvirinae* I: 26; III: 247  
*Coronaviridae* I: 26, 40  
*Coronavirus* I: 40  
*Culicoides* II: 369  
*Cypovirus* I: 37  
*Cytomegalovirus* I: 30; III: 189
- Densovirus* I: 35  
*Dependovirus* I: 35; III: 68
- Enterovirus* I: 49, 50, 51; II: 191, 192  
 — *polio 1* I: 24  
*Entomopoxvirinae* I: 27; III: 638  
*Equus caballus* I: 24  
*Escherichia coli* I: 236, 237, 239, 249, 254; II: 155
- Fijivirus* I: 37  
*Filoviridae* I: 26, 44  
*Flavivirus* I: 38, 39, 40
- Gallus domesticus* I: 24  
*Gammaherpesvirinae* I: 30; III: 189, 190
- Haemagogus* I: 268  
*Hepadnaviridae* I: 26, 34  
*Herpesviridae* I: 26, 29; III: 186, 187, 189  
*Herpesvirus ateles* I: 331, 337, 356, 361, 362, 406  
 — *saimiri* I: 331, 337, 356, 361, 406, 407  
 — *sylvilagus* I: 331, 362  
*Homo sapiens* I: 24  
*Hyalomma* I: 273
- Influenzavirus* I: 45, 46  
*Iridoviridae* I: 26, 28  
*Iridovirus* I: 28  
*Ixodes ricinus* II: 389  
*Lagothrix* sp. III: 408

- Lentivirinae I: 48, 49  
*Lentivirus* I: 48  
*Leporipoxvirus* I: 27, 28; III: 247  
*Lepus americanus* II: 383  
*Listeria monocytogenes* II: 51  
*Lymphocryptovirus* I: 30; III: 190, 197  
*Lyssavirus* I: 42, 43
- Maccacus cynomolgus* II: 228  
*Marmata monax* III: 287  
*Mastadenovirus* I: 23, 24, 31, 32; III: 112  
*Mastomys natalensis* I: 346, 348; II: 393  
*Meleagris gallopavo* I: 24  
*Melontha melontha* III: 247  
*Microtus* II: 392  
*Morbillivirus* I: 41, 42; II: 480  
*Muromegalovirus* I: 30; III: 189  
*Mus musculus* I: 24; II: 393  
 — — *mollosinos* I: 463
- Nairovirus* I: 46, 47; II: 366, 367  
*Neacomys guianae* II: 393
- Oncovirinae I: 48, 49  
*Orbivirus* I: 36, 37  
*Orthomyxoviridae* I: 26, 45; II: 367  
*Orthopoxvirus* I: 26, 27, 28; III: 247  
*Oryzomys albicularis* II: 393  
 — *buccinatus* II: 393  
 — *goeldi* II: 393  
 — sp. II: 393  
*Ovis aries* I: 24
- Papillomavirus* I: 32, 33  
*Papovaviridae* I: 26, 32, 33  
*Paramyxoviridae* I: 26, 41; II: 367  
*Paramyxovirus* I: 41, 42  
*Parapoxvirus* I: 26, 27, 28; III: 247  
*Parvoviridae* I: 26, 35; III: 67, 68  
*Parvovirus* I: 35; III: 68  
*Pestivirus* I: 39, 40  
*Petropus poliocephalus* II: 268  
*Phasianus colchicus* I: 24
- Phlebovirus* I: 46, 47; II: 366, 367, 384, 385  
*Phytoreovirus* I: 37  
*Picornaviridae* I: 26, 49, 50  
*Pneumovirus* I: 41, 42; II: 480  
*Poikilovirus* I: 30; III: 189  
*Polyomavirus* I: 32, 33  
*Poxviridae* I: 26, 27; III: 246, 247  
*Praomys jacksonii* II: 393
- Rana pipiens* I: 361  
*Ranavirus* I: 28  
*Rattus norvegicus* II: 392  
*Reoviridae* I: 26, 36, 37; II: 259, 267  
*Reovirus* I: 36, 37  
*Retroviridae* I: 26, 48, 49  
*Rhabdoviridae* I: 26, 42; II: 367  
*Rhadinovirus* I: 30, 31; III: 190  
*Rhinovirus* I: 50, 51; II: 191, 192  
*Rotavirus* I: 36, 37  
*Rubivirus* I: 39
- Saimiri* III: 190, 408  
*Sigmodon hispidus* II: 393  
*Simplexvirus* I: 29, 30; III: 189  
*Spermophilus beecheyi* III: 287  
*Spumavirinae* I: 48  
*Spumavirus* I: 48  
*Suipoxvirus* I: 27, 28; III: 247  
*Sus domesticus* I: 24  
*Sylvilagus* I: 346, 347, 362
- Tamias striatus* II: 383  
*Thetalympocryptovirus* I: 30, 31; III: 190  
*Togaviridae* I: 26, 38, 39
- Uukuvirus* I: 46; II: 366, 367, 389, 390
- Varicellavirus* I: 30  
*Vesiculovirus* I: 42, 43
- Xenopus* II: 54

## Адено-ассоциированные вирусы (AAV)

- I: 147; III: 67—96, 160
- белки капсида III: 72—73
- взаимодействие с аденовирусами III: 87, 90—95, 160
- геном III: 69—72
- дефектные интерферирующие частицы (ДИ-частицы) III: 86—87
- интеграция III: 89—90
- латентная инфекция III: 87—90
- репликация ДНК III: 75—82, 87
- — — механизм III: 71
- синтез РНК III: 82—84
- «спасение» III: 89—90

## Аденовирус дикого типа, реконструкция I: 242

## Аденовирус-3 крупного рогатого скота I: 356

## Аденовирусные вакцинные штаммы II: 161, 162

## Аденовирусы (Ad) I: 79—81, 135, 168, 169, 330, 333, 336—337, 353—356, 384—401; III: 103—167, 357

- Т-антигены III: 114—115, 129
- взаимодействие с адено-ассоциированными вирусами (AAV) III: 87, 90—95, 160
- — другими вирусами III: 160—162
- — цитоплазматическими микротрубочками I: 322—323
- вирион (вирусная частица) I: 79—81
- гемагглютинация III: 112—113
- гибридизация ДНК—ДНК III: 114, 136
- гибридные вирионы III: 162—163
- делеции генома I: 252—253
- дефектные интерферирующие вирусы (ДИ-частицы) I: 168
- — частицы III: 159—160
- ДНК I: 130
- — однопочечная III: 135, 137
- животных I: 355—356
- капсид III: 108—109
- картирование геномов III: 120—121, 149, 155—156, 164—165

## — кишечные I: 354

## — классификация I: 330, 331; III: 112—116

## — клеточная трансформация I: 333—334, 336—337, 355

## — клеточный репрессор III: 127

## — концевой полипептид 55K III: 107, 109

## — литическая инфекция III: 94

## — литический цикл III: 117—118

## — мутантные III: 92—93

## — мутанты, картирование III: 164—165

## — — получение III: 163—164

## — — с делецией II: 174—175, 176

## — ts-мутанты III: 104, 165—166

## — области ранней транскрипции III: 91—94

## — — E1, E2, E3 и E4 III: 131—133

## — онкогенность I: 14—15, 353—354, 355—356

## — — для грызунов III: 113

## — переключение ранней транскрипции на позднюю III: 147—148

## — подавление онкогенности III: 94

## — — репликации III: 94

## — поздняя транскрипция III: 146—147

## — полипептиды III: 108—112

## — развитие рака у человека I: 355

## — разделение I: 129

## — ранняя транскрипция III: 120—129

## — регуляция экспрессии ранних генов III: 125—129

## — репликация ДНК III: 133—146

## — сборка вирионов III: 156—159

## — свойства I: 332—333

## — связь с развитием рака у человека II: 175

## — серотипы 2, 7, 12 III: 146

## — синтез ДНК III: 128, 139—146

## — сплайсинг III: 125, 148, 150—151

## — структура III: 104—106

## — — генома I: 384—386

## — — ДНК III: 134—138

## — условно-летальные температурочувствительные мутанты III: 163



- фрагменты Оказаки III: 134, 135, 136
- хелперные функции III: 91—94
- циклогексими́д III: 125, 126, 127, 136
- человека I: 353—355, 384—401
- — Т-антигены, трансформация клеток I: 389—391
- — — Е1А, активация и репрессия клеточных генов I: 392—393
- — — — ранних вирусных генов I: 392—393
- — — — биологическая функция I: 391—392
- — — — репликация вирусов I: 397
- — — — организация и экспрессия генома I: 384—389
- — 12S-мРНК Е1А, клеточная трансформация I: 396
- — 13S-мРНК Е1А, клеточная трансформация I: 393, 395
- экспрессия Т-антигена SV40 I: 245
- S-аденозилгомоцистеин II: 64
- S-аденозилметионин II: 64
- Аденозиндезаминаза II: 98
- Азотистая кислота как мутаген I: 187
- Активность, стимулирующая размножение клеток (АСР) II: 70
- Актиномицин D II: 218, 223, 351, 374, 375, 459; III: 304
- Алкилирующие агенты I: 187—188
- «Аллореактивные» Тс-клетки II: 14
- Альфовирусы I: 163—164; II: 343, 344, 345, 347, 353, 357, 359
- вирус О'ньонг-ньонг I: 274
- гликопротеины II: 355—357, 358
- заражение пермиссивных клеток II: 359—360.
- репликация II: 347—352, 357
- сборка и почкование II: 357—359
- синтез структурных белков II: 353—355
- сравнение с флавивирусами II: 359
- цикл репликации II: 353
- Альфа-герпесвирусы, трансформация клеток I: 401—404
- Амантадин II: 95, 127—130
- опосредованный рецепторами эндоцитоз II: 424
- противовирусная активность in vitro II: 128
- — — in vivo II: 128
- профилактика и лечение гриппа А II: 129—130
- токсичность II: 128
- Амилоидные бляшки III: 421, 429, 437, 438
- фибриллы III: 387, 427, 430, 440
- Аминокислотная последовательность Gly-Asp-Ser-Gly капсидного полипептида II: 353
- Аммония хлорид, подавление литической реовирусной инфекции II: 310
- — слияние VSV с мембраной II: 424
- Антивирусная терапия I: 246
- Антиген вируса Эпштейна—Барр (EBNA) I: 238
- вирусного капсида I: 360
- гепатита В поверхностный (HBsAg), гуморальный иммунный ответ III: 309
- — — сердцевинный (HBcAg), гуморальный иммунный ответ III: 309
- ОКТ-4 (Ieu 3) III: 345
- презентация II: 10—11
- е-Антиген гепатита В (HBeAg), природного III: 300—301
- N-антиген II: 236
- S-антиген II: 237
- Т-антиген большой, репликация ДНК SV40 III: 52
- Антигенная трансформация N—H II: 236—237
- Антигенные детерминанты идиотипические (идиотипы) II: 18
- Антигенный дрейф I: 111, 116
- «Антигенный отбор» I: 116
- Антигенный сдвиг I: 274
- Антиген-презентирующие клетки (АПК) II: 10—11, 306; III: 357
- Антигены вирусные II: 9—10, 13, 401, 402
- гистосовместимости I: 290, 291
- Т-зависимые II: 9
- защитные II: 146, 164
- поверхностные II: 145, 146, 147
- формирование иммунитета II: 145
- МНС II: 7—8, 10, 14, 15, 23, 154
- Н-антигены II: 236
- Т-антигены I: 244, 245, 251, 255, 334—335, 336—337, 340—341, 365, 367, 368—376, 386—393, 397—401, 412; II: 174
- Антиидиотипические антитела I: 266; II: 18—19
- «Антиидиотипы» I: 18
- Антирецептор I: 127
- Антирецепторы вирусные III: 202
- у пикорнавирусов II: 220, 221
- Антитела II: 17—18, 21, 25, 28, 29, 31, 149—150
- анти-АТК III: 333, 350
- комплексы антиген — антитело II: 402

- вирус—антитело (иммунные комплексы) II: 31
- лизис зараженных вирусом клеток II: 28—29
- моноклональные I: 17, 113, 116, 146, 285; II: 145, 147, 305
- антиклеточные II: 218
- нейтрализация вируса II: 25—26, 27, 303—305
- противовирусные I: 290, 292, 293
- Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) II: 21, 24, 148
- Арбовирусы II: 344
- Аренавирусы I: 272
- белки II: 396—397
- блот-гибридизация II: 395
- виды Нового и Старого Света II: 392, 393
- внутренний нуклеокапсид II: 394—395
- генетические свойства II: 399—401
- гликопротеины II: 396—399
- персистентная инфекция II: 399, 402, 403
- почкование II: 394, 401
- рекомбинация II: 399, 400
- репликация II: 401
- рибосомные РНК II: 394, 395
- рибосомы II: 394, 396
- РНК L и S II: 395, 397
- сегмент S II: 395, 397, 399, 400
- функции геномной РНК I: 132—133
- Арилдон II: 130
- Аттенуация вирусов II: 161—162, 163—166, 168—169, 172, 173
- Аутизм III: 436
- Аутоиммунные антитела против (10 нм)-нейрофиламентов III: 409, 416—417, 440
- заболевания и инфекции II: 18
- Аутоиммунный ответ на (10 нм)-нейрофиламенты III: 416—417
- Аффинная хроматография, очистка на колонках с конканавалином III: 297
- Ацикловир II: 104—113
- активность *in vivo* на животных II: 105—106
- клинические испытания II: 107—113
- механизм действия II: 104
- противовирусная активность *in vitro* II: 105
- токсичность II: 106
- устойчивость вирусных мутантов II: 105
- Бактериальные вирусы *см.* Бактериофаги
- Бактериофаг MS2 II: 152
- Бактериофаги, генетика I: 13—14
- индукция I: 144, 145
- интегрированные дефектные вирусные геномы I: 144—146
- лизогения I: 14, 144
- обнаружение I: 13
- спасение маркера I: 145
- Белки вирусные, получение с помощью клонированных вирусных ДНК II: 154—157
- репликация вирусного генома I: 125
- свойства и функции III: 208—211
- синтез I: 125, 459—461; II: 434—436
- упаковка генома I: 125, 461
- функции I: 125
- вирусных оболочек, биосинтез I: 92—95. *См. также* Гликопротеины вирусные мембранные
- вирус-специфические I: 308
- клетки-хозяина, подавление синтеза II: 226—227
- мембранные I: 96
- неструктурные вируса гриппа А II: 454
- слитные *gag-onc* I: 471
- слияния, антигенная структура II: 481
- *gag* I: 460
- рХ III: 339, 343—344
- VP1, VP2 и VP3 I: 77, 368
- Р-белки, номенклатура II: 460—462
- роль в транскрипции II: 460
- синтез РНК вируса гриппа А II: 453, 460—462
- Белковая субъединица I: 55
- Белковые субъединицы, типы связывания I: 62—63
- Белок  $\beta$ -галактозидаза—EBNA I: 238
- «Белок приона» скреппи III: 390, 425, 440
- Белок *abl* I: 472
- F I: 285—286
- вируса Сендай I: 105, 107
- Н, иммунный ответ II: 158
- ICP5 I: 323, 324
- ICP8 I: 253, 323, 324
- N коронавируса III: 18
- сборка нуклеокапсида I: 157—158
- р53 I: 370; III: 37
- связывание с большим Т-антигеном I: 334

- р62 II: 354—357, 358
- — превращение в Е2 и Е3 II: 355, 356—357, 358
- VP1 II: 164, 165
- VPg II: 195—196, 198, 229, 230, 231
- G-белок I: 318, 319; II: 436, 437, 438
- M-белок вирионов рабдовирусов II: 437—438, 439
- оболочка вируса гриппа II: 453, 454, 471
- N-белок РНП рабдовирусов II: 434
- P-белок вируса Сендай II: 476—477
- src-Белок I: 472
- Бета-герпесвирусы, трансформация I: 404—405
- Бешенство, механизм передачи вируса I: 269, 272—273
- немое I: 273
- Блот-гибридизация II: 395
- по Саузерну III: 348
- Болезнь Альцгеймера III: 414, 416, 417, 418, 427, 429, 436, 438
- Крейцфельда—Якоба (БКЯ) I: 296; II: 127; III: 383, 387, 389, 411—418
- — амилоид III: 387
- — аутоиммунные антитела III: 387, 417, 427
- — аутоиммунный ответ III: 416—417
- — аутосомный ген III: 416
- — передача III: 411—412, 416
- — — от человека человеку III: 415—416
- — предосторожности III: 417—418
- — распространенность III: 414
- — терапия III: 418
- — «трансмиссивельные вирусные деменции» (ТВД) III: 414
- — фибриллы, связанные со скреппи (ФСС) III: 387, 439
- — эпидемиология III: 414—416
- — Паркинсона III: 417, 436
- Большие гранулярные лимфоциты (БГЛ) II: 19
- Бромвинилдезоксисуридин (БВДУ) II: 113, 114—115
- Буньявирусы, вертикальная (трансовариальная) передача II: 373, 381
- вирулентность II: 383
- вирус LAC II: 380, 381, 382, 383
- — SSH II: 374, 375, 380, 381, 382, 383
- генетические свойства II: 378—384
- генетический дрейф II: 371
- геномная РНК I: 132
- генотипическая изменчивость II: 380
- гликопротеины II: 383
- интерференция II: 380
- клеточные рецепторы I: 284
- реассортанты II: 380, 382, 383
- рекомбинация II: 373, 378, 380
- репликация II: 373—375, 380, 383
- РНК-геном II: 367
- род *Bunyavirus* II: 367, 368, 371—384
- — — вирусные гликопротеины II: 372
- — — нуклеокапсиды II: 372
- — — РНК большая (РНК L) II: 372
- — — — малая (РНК S) II: 372
- — — — средняя (РНК M) II: 372
- — — мРНК II: 373
- — — свойства II: 372—373
- — — серологическая классификация II: 368, 371
- сегменты РНК L, M и S II: 378, 380
- транскрипция II: 374, 383
- трансляция II: 374, 375
- членистоногие как переносчики II: 373, 380, 381
- Вакцина инактивированная против корь, белки F и H II: 158**
- — — гиперчувствительность замедленного типа II: 160
- Вакцины I: 17—18, 116—117; II: 150—168**
- вирусные живые I: 246, II: 161—168
- — — аттенуированные II: 168—178
- — — недостатки II: 166—168
- — — преимущества II: 166
- инактивированные, недостатки II: 158—159
- — потенциальные источники антигенов II: 152—157
- — — преимущества II: 157—158
- — — разрешенные II: 150—151
- Векторы на основе вируса SV40 I: 244—245**
- — — фага M13 I: 237
- Ветрянка у иммунодефицитных больных II: 99, 102**
- Видарабин (аденинарабиноза) II: 96—104, 108**
- клинические испытания II: 98—104
- противовирусная активность *in vitro* II: 96
- — — *in vivo* II: 96—97
- Виропексис I: 449; II: 220, 285**
- Вирус бешенства II: 165, 423—424**



- — аминокислотные последовательности I: 98
- — гликопротеин G I: 288
- — распространение I: 283
- — болезни Марека (MDV) I: 337, 361; III: 186
- Буньявера II: 366
- Буэнавентура (BUE) дикого типа II: 385
- бычьего лейкоза I: 466
- везикулярного стоматита (VSV) I: 75—76, 139, 143, 149—153, 215
- — — аминокислотные последовательности I: 99
- — — G-белок II: 423, 436, 437
- — — влияние интерферона II: 58
- — — геном II: 421, 425
- — — геномная РНК II: 422, 426
- — — гликопротеин G I: 75, 239
- — — делеционный мутант (HRL T1) II: 429
- — — ДИ-частицы I: 139—140, 142, 143, 149—153, 215; II: 425, 430, 431, 432
- — — клеточные рецепторы II: 423
- — — ts-мутанты II: 422, 429, 442
- — — подавление синтеза клеточной РНК II: 440
- — — полимеразы II: 427, 428
- — — противовирусная активность интерферона II: 121
- — — размножение на клетках ВНК<sub>21</sub> I: 143
- — — репликация II: 429, 430—431, 439
- — — мРНК I: 318—319
- — — сборка нуклеокапсида I: 175
- — — связывание белков с цитоструктурами I: 319
- — — серотип Индиана II: 421, 437
- — — — Нью-Джерси II: 421, 437
- — — спектр хозяев II: 421, 423
- — — спонтанный мутагенез I: 186
- — — структурные белки I: 315
- — — транскрипция II: 427, 430
- — — эндоцитоз II: 424
- Вirus ветрянки/опоясывающего лишая (VZV) I: 295, II: 29—30, 93, 96, 103, 114, 115
- — — противовирусная активность ацикловира II: 105, 111—112
- — — — бромвинилдезокс-синуридина II: 114—115
- — — — — интерферона II: 121, 125
- ветряной оспы (ветрянки) I: 270, 280
- висны I: 296
- гепатита I: 16, 18
- — земляной белки (GSHV) I: 339; III: 287, 298—299, 315
- — — мышей (MHV) I: 289, III: 10, 11, 12—13, 19
- — — штамм JHM I: 285
- — — сурков (WHV) I: 339, 408; III: 287, 298, 303, 312
- — — A II: 190
- — — B (HBV) I: 20, 135—136, 267, 269, 273, 280, 329, 330—331, 339; II: 91; III: 287—317, 359
- — — — антиген I: 147, 273
- — — — — поверхностный (HBsAg) II: 155; 288—289, 303, 304, 314, 315
- — — — — иммунизация III: 293
- — — — — полипептиды III: 294—298
- — — — — структура III: 293—299
- — — — — сердцевинный (HBcAg) III: 299—300, 303, 304, 314, 315
- — — — — е-антиген (HBeAg) III: 289, 300—301, 314
- — — — — вирусная ДНК I: 130; III: 301—303, 315—317
- — — — — дельта-агент III: 313—314
- — — — — ДНК-полимераза III: 301, 304
- — — — — инфекции II: 126
- — — — — механизм репликации III: 303—308
- — — — — обратная транскриптаза (ДНК-полимераза) III: 305
- — — — — первичная гепатоцеллюлярная карцинома (гепатома) III: 307—308, 309, 314—317
- — — — — рестрикционные эндонуклеазы III: 306
- — — — — РНК генома дельта-агента I: 147
- — — — — синтез ДНК III: 301, 304, 305—306
- — — — — — однопочечной I: 147
- — — — — — структура нуклеокапсида (сердцевины) III: 299—300
- — — — — — тканевая тропность III: 308
- — — — — — уток (DNBV) I: 339
- — — — — — физическая и генетическая карты ДНК III: 302
- гепатознцефаломелита II: 265
- герпеса, тимидинкиназы II: 89
- гриппа, антигеномы II: 467
- — внутримолекулярная рекомбинация I: 208
- — гемагглютинин I: 100—102, 127, 255, 287

- — — аминокислотные последовательности I: 93
- — — антигенная структура I: 111—114
- — — и нейраминидаза I: 15
- — — фузионная активность I: 106—109
- — — гликопротеины, связанные рецептором клетки-мишени I: 103, 105
- — — ДИ-частицы I: 159—162, 285
- — — сложная мозаичная структура I: 161
- — — механизм транскрипции II: 458—465, 467
- — — нейраминидаза I: 98, 102—103, 287
- — — антигенная структура I: 117
- — — новые серотипы I: 274
- — — патогенез I: 280
- — — репликация I: 278, 280
- — — РНК I: 274
- — — сборка I: 94—95
- — — эндосомы II: 474
- — — А, азиатский штамм II: 145
- — — аттенуация II: 172—173
- — — и иммуногенность *ts*-мутантов II: 170—171
- — — белки нуклеокапсиды II: 453, 461
- — — — оболочки II: 453—454
- — — гемагглютинин (НА) II: 154, 155, 453, 455—458, 470
- — — генетические взаимодействия II: 467—470
- — — геном II: 451
- — — метилтрансферазная активность II: 464
- — — нейраминидаза (НА) II: 453, 470, 471, 472—473
- — — противовирусная активность амантадина II: 127—128
- — — профилактика и лечение II: 129—130
- — — птиц II: 173
- — — репликация РНК II: 466—467
- — — РНК-зависимая РНК-полимераза (транскриптаза) II: 458—459, 460
- — — сборка вирионов II: 470—473
- — — синтез мРНК II: 464—465
- — — человека, гены PR-8 II: 172
- — — инактивированная вакцина II: 160
- — — реассортант II: 173
- — — С, оболочки I: 90—92
- — — дене I: 269, 271, 275
- — — комплексы вирус — антитело II: 31
- — — дикого типа I: 185, 190, 292
- — — желтой лихорадки I: 12, 265, 268, 275; II: 161, 163
- — — вакцина I: 18
- — — вакцинный штамм 17D II: 164—165
- — — живая вакцина II: 166, 167
- — — зайца-беляка (SSH) II: 374, 375, 377, 379, 381, 382, 383
- — — инфекционного бронхита птиц (IBV) III: 10, 13, 19
- — — колорадской клещевой лихорадки II: 49, 262
- — — кори I: 293, 297; II: 32
- — — вакцинные варианты II: 167
- — — полипептид M I: 297
- — — размножение в культуре клеток I: 265
- — — специфические Tc II: 24
- — — краснухи I: 283, 292; II: 161, 162, 163, 167
- — — вакцинный вариант II: 163, 167
- — — крымской геморрагической лихорадки II: 367
- — — куру III: 409, 411, 429, 432
- — — кустистой карликовости томатов (TBSV) I: 70—74
- — — карты электронной плотности I: 72—73
- — — — РНК I: 73
- — — соединительные «руки» С-субъединиц I: 70—72
- — — — структура I: 62—63
- — — Ла Кросс (LAC) II: 369, 371, 375, 378—383
- — — олигонуклеотидные карты сегментов L, M и S II: 379
- — — Ласса II: 393
- — — лейкоза кошек III: 357, 359
- — — крупного рогатого скота (BLV) III: 341
- — — мышей (MuLV) экотропный эндогенный I: 463
- — — Абельсона (A-MuLV) I: 414, 471—472
- — — Молони (Mo-MuLV) I: 438, 463, 465; II: 66
- — — птиц I: 438, 439, 465, 466, 467, 473
- — — эндогенный I: 462
- — — леса Семлики (SFV) I: 87; II: 344, 347, 353, 354
- — — аминокислотные последова-

- тельности мембранных гликопротеинов I: 98, 99  
 — — ДИ-геном I: 161, 163  
 — — — интерферон II: 36  
 — — — кристаллизация I: 89, 90  
 — — — *ts*-мутанты II: 48  
 — — — нуклеокапсид I: 87  
 — — — структура ДИ-частиц I: 163  
 — лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) I: 48, 143, 144, 272, 283, 287, 293; II: 14  
 — лихорадки Долины Рифт II: 386  
 — Марбург I: 274  
 — Маучо I: 48, 267; II: 403  
 — mosquitoной неапольской лихорадки (SFN) II: 367  
 — некроза табака сателлитный (STNV) I: 74, 146  
 — ньюкаслской болезни куриный (NDV) II: 475  
 — О'ньонг-ньонг I: 274—275  
 — опухоли молочных желез мышей (MMTV), длинный концевой повтор (LTR) I: 245—246  
 — Орибока II: 383  
 — осповакцины I: 27, 246; II: 161; III: 246, 248, 249, 250, 252, 256, 260, 262—263, 265, 272  
 — — выделенные ферменты III: 252—253  
 — — геном III: 254, 265, 268  
 — — гибриды III: 274—275  
 — — ДНК-полимераза III: 264, 266  
 — — обработка зараженных L-клеток интерфероном II: 57—58  
 — — полипептиды III: 250—251  
 — — ранняя транскрипция III: 257—260  
 — — репликативный цикл III: 256—272  
 — — самозатравочная модель репликации ДНК III: 265  
 — — структура ДНК III: 254, 255, 256  
 — — трансляционная карта генома III: 262—263  
 — — условно-летальные мутанты III: 273—274  
 — — химический состав III: 249—250  
 — папилломы кролика *Sylvilagus* (CRPV) I: 346, 347, 377, 379  
 — парагриппа типов 1—4 II: 478  
 — Пичинде II: 393, 395, 396, 397, 399, 400, 403  
 — полиомелита (полиовирус) I: 204, 213, 278, 281, 283, 291, 292; II: 151, 190, 191, 216—217, 224  
 — — S-антиген II: 237  
 — — блокирование репликации I: 284  
 — — внутримолекулярная рекомбинация I: 207  
 — — делеции родительского генома I: 162  
 — — делеционные мутанты II: 177  
 — — инактивация кэп-связывающего белка I: 286  
 — — нейровирулентность II: 228  
 — — первичная репликация I: 281  
 — — плавучая плотность II: 205  
 — — проникновение в организм хозяина I: 281  
 — — размножение в культуре клеток I: 265  
 — — репликативная форма (РФ) РНК II: 230  
 — — рецепторы II: 217, 218  
 — — сборка природных пустых капсидов (ППК) II: 237  
 — — серотипы I: 266  
 — — синтез белков клетки-хозяина II: 227  
 — — вирусной РНК II: 229—231  
 — — клеточной РНК II: 225  
 — — скорость адсорбции II: 216  
 — — температурочувствительные (*ts*) мутанты II: 198  
 — — типа 3, аттенуация вакцинного штамма II: 164  
 — — физическая карта генов I: 184  
 — — физические свойства II: 199—201  
 — — цикл репродукции I: 126  
 — — полиомы мышей (полиомавирус, РУ), Т-антигены I: 367—368  
 — — — биохимические свойства I: 373—376  
 — — — большой Т-антиген I: 368, 371—373; III: 33—34, 36, 57  
 — — — ген хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) III: 42  
 — — — генетическая карта I: 367  
 — — — геном I: 366—368; III: 31, 55  
 — — — литический цикл III: 40  
 — — — малый Т-антиген I: 368, 371—373  
 — — — мутанты по кругу хозяев I: 249; III: 40  
 — — — последовательность ССААТ III: 41, 50  
 — — — ТАТА-последовательность III: 41, 50  
 — — — промотор поздней транскрипции III: 44  
 — — — регуляция транскрипции III: 41—45



- — — средний Т-антиген I: 368, 371—373; III: 39—40
- — — трансформация клеток I: 371—373
- — — опухолевая III: 34
- — — поддержание III: 35
- простого герпеса (HSV) I: 135, 189, 288, 294, 330, 331, 357—358; III: 224, 225, 226
- — — gD-антиген II: 177
- — — ген тимидинкиназы I: 170, 247, 249—250, 252, 295, 382
- — — геном I: 170, 221, 246, 253; II: 176
- — — гиперчувствительность замедленного типа II: 23
- — — ДИ-частицы I: 167
- — — мутанты с дефектной тимидинкиназой I: 295
- — — мутации, резистентные к моноклональным антителам (та-мутации) I: 256
- — — передача от человека к человеку I: 270
- — — противовирусная активность ацикловира II: 105—106, 107, 109—111
- — — — — видарабина II: 96—97
- — — — — интерферона II: 124, 125
- — — противовирусные вещества II: 91
- — — синцитиальные мутанты (*syn*-мутанты) I: 189
- — — типа 1 I: 30, 198—199, 270, 338, 357
- — — 2 I: 30, 270, 338, 339, 357—358
- — — энцефалиты II: 100—101
- — — герпетические II: 91, 94, 98, 100—101, 106, 107, 125, 130
- — — эпителиальный кератит II: 107
- псевдобешенства III: 127, 223
- птичьего лейкоза II: 166
- Пунто Торо (PT) дикого типа II: 385
- саркомы мышей Молони (Mo—MuSV) I: 433, 435, 438, 444
- — Рауса (RSV) I: 14, 414, 434, 435, 440, 443—444, 468, 469
- — Фуджинами I: 472
- свиного гриппа I: 275
- Сендай I: 159
- — белок F I: 105, 107, 285—286
- — геном II: 451, 475
- — гиперчувствительность замедленного типа II: 17
- — ДИ-частицы II: 479
- — нейраминидаза II: 453—454
- — нуклеокапсидные белки II: 453, 477
- — образование интерферона II: 119
- — синтез РНК II: 478
- — слияние мембран II: 474
- — спонтанные мутации II: 479
- — транскрипция II: 476, 477
- Синдбис (SIN) II: 27, 344, 345, 347, 353
- — аминокислотные последовательности гликопротеинов I: 98—99
- — вирион I: 87
- — комплементация между *ts*-мутантами I: 195
- — *ts*-мутанты II: 48
- — оболочка I: 86—89
- — организация и экспрессия генома II: 348
- — поверхностные гликопротеины I: 87
- — поверхность I: 87
- — РНК II: 347—348
- — — ДИ-частиц II: 351
- — содержание слюевой кислоты I: 289—290
- — структура генома II: 344
- — — ДИ-частиц I: 163
- — трансляция *in vitro* II: 349
- синего языка (орбивирус) II: 261
- скрейпи III: 421—427, 429
- RS, *ts*-мутанты II: 170, 171
- SV40 I: 183, 244—245, 320—322, 330—331, 343
- — Т-антигены I: 244, 245, 251, 255, 333, 334, 367, 368
- — большой Т-антиген I: 251, 334, 337, 368—370, 376; III: 34—37, 47—50, 51, 52, 53, 56—57
- — — функции *in vivo* и *in vitro* III: 35
- — влияние интерферона на мРНК для Т-антигена II: 62
- — геном I: 366, 367, 368; II: 174; III: 31, 55
- — делеционные мутанты I: 251—252
- — ДНК I: 244, 344, 366
- — интерферон II: 58, 59
- — как вектор I: 244—245
- — — вирус-помощник для аденовирусов III: 161—162
- — комплементация I: 196
- — литическая инфекция III: 31—32

- — малый Т-антиген I: 239, 334, 368; III: 34, 35, 37, 38—39
- — мутанты по кругу хозяев III: 40
- — поздняя транскрипция III: 48—49
- — полностью перmissive клетки-хозяева III: 30
- — ТАТА-последовательность III: 46
- — ранняя область транскрипции I: 251—252
- — транскрипция III: 49, 50
- — регуляция транскрипции III: 46—50
- — репликация ДНК III: 50—54
- — сайт-специфический мутагенез I: 253—254
- — свойства I: 332—333
- — связь вирионов с ядерным маг-риксом I: 321
- — мРНК с цитоскелетом I: 322
- — секвенирование ДНК-генома I: 237
- — спасение маркера I: 243
- — транскрипция РНК I: 322
- — трансформация I: 215, 333—334, 343, 344, 403
- — инфицированных клеток III: 56—57
- — неpermissive клеток III: 30
- — — опухолевая III: 34
- — — поддержание III: 34—35
- — трансформирующая область I: 333, 334, 389
- — экспрессия клеточных генов I: 413
- — — ранних генов III: 33—41
- — табачной мозаики (TMV) I: 15, 54, 157; II: 448
- — — структура I: 65—69
- — Укуниемии I: 46, 87; II: 367, 389
- — гликопротеины II: 390
- — оболочка I: 89—90
- — характеристика II: 389—390
- — фибромы Шоупа III: 273
- — Френд, вызывающий образование фокусов в селезенке (SFFV) I: 467
- — Хантаан II: 369, 391—392
- — хронического паралича (пчел) (CPV) I: 148
- — Хуни I: 48, 272, 274, 290; II: 396, 403
- — Эбола II: 126
- — экстремелии (оспы мышей) I: 281
- — энцефаломнокардита (ЕМС) II: 41, 191, 192, 194, 205, 217, 227
- — Эпштейна—Барр (EBV) I: 284, 295, 329, 330, 337—338, 359—360, 405, 407; II: 91; III: 359
- — антиген вирусного капсида I: 360
- — геном II: 120
- — ингибирующее действие ацикло-вира II: 105, 112
- — Тс-клетки II: 23—24
- — онкогенность I: 359—360
- — передача I: 269, 270
- — применение интерферона II: 125
- — ядерный антиген (EBNA) I: 238
- — южной мозаики бобов I: 74
- — ядерного полиэдруса *Autographa californica* II: 73
- — ящура (FMDV) I: 207, 213; II: 10, 152, 155, 190, 192, 194, 205, 216, 225
- — белок 2С II: 198
- — вирионы II: 200, 206
- — внутримолекулярная рекомби-нация I: 207
- — геном II: 196, 197
- — капсидный белок VP1 II: 152, 155, 208—209
- — свойства РНК II: 194—195
- — 12S-субъединица II: 204
- Вирусная частица, белковые субъеди-ницы I: 56
- — субансамбли I: 56, 57
- Вирусные болезни, механизмы переда-чи I: 269—273
- геномы дефектные интегрирован-ные I: 144—146
- гены, регуляция экспрессии I: 224
- заболевания, иммунология I: 16—17
- — отличие от вирусной инфекции I: 10
- — патологические эффекты I: 124
- — профилактика и лечение I: 17—18
- — эпидемиологические модели I: 269
- — оболочки I: 86—92
- — слияние с клеточной мембраной I: 86, 105—109
- мРНК I: 16
- структуры, номенклатура I: 55
- частицы, принципы структурной ор-ганизации I: 56—58
- — разборка I: 81
- — симметрия I: 58—64
- — типы I: 54
- — — структур I: 54—55
- частицы-предшественники II: 281
- «Вирусные фабрики» II: 291

- Вирусология, история методов и концепций I: 12—18
- как область науки I: 11
  - опухолей I: 329—330
- Вирусы, генетические взаимодействия I: 192—209
- гибридные III: 274—275
  - гриппа, внутрисегментная (генная) рекомбинация II: 468
  - группы ЕСНО-10 II: 265—266
  - дефектные интерферирующие (ДИ-частицы) I: 138—144
  - животных I: 214—215
  - — генетика I: 183—225
  - — генетическая методология I: 184—185
  - — — реактивация I: 209
  - — — генная инженерия и генетика I: 223—225
  - — гетерозиготность I: 209—210
  - — делеционные мутации I: 251—253
  - — индуцированные мутации I: 187—188
  - — интеграция I: 217—218
  - — интерференция I: 210—211
  - — картирование геномов I: 219—223
  - — клонирование рекомбинантных ДНК I: 235—237
  - — комплементация I: 193—196
  - — механизмы рекомбинации I: 207—209
  - — мутанты I: 188—192, 255—256
  - — — по спектру хозяев I: 189
  - — персистентная инфекция I: 218—219
  - — рекомбинация I: 196—207
  - — спонтанные мутации I: 186—187
  - — супрессия I: 211—213
  - — точечные мутации I: 253—254
  - — трансформация I: 215—217
  - — условно-летальные *ts*-мутанты I: 190
  - — фенотипическое смешивание I: 213—214
  - — экспрессия генов I: 224, 237—240, 247—248
  - и клетка-хозяин, взаимодействие I: 215—219
  - икосаэдрические II: 147
  - имеющие оболочку I: 54, 84—86
  - инактивированные как индукторы интерферона II: 49—51
  - индукция опухолей I: 14—15, 329, 357, 365
  - как антигены II: 9—10
  - — внутриклеточные организмы I: 264
  - Т-клеточных лейкозов человека (HTLV) I: 433, 436, 439, 440, 441, 468, III: 331—371. *См. также* HTLV-I, HTLV-II, HTLV-III, СПИД
  - Коксаки I: 213; II: 205, 216, 217, 218, 219
  - культура клеток I: 13
  - мади I: 437
  - негенетические взаимодействия I: 209—215
  - независимые от помощника I: 443
  - неканонические III: 383—440
  - — атипические свойства III: 385
  - — классические свойства III: 386, 425
  - — методы инактивации III: 425—426
  - — отсутствие иммунного ответа III: 386
  - новые, происхождение I: 273—276
  - однозначная идентификация I: 23—24
  - опухолеродные I: 268, 329, 330—333, 338, 340—343. *См. также* Опухолеродные ДНК-содержащие вирусы
  - — влияние интерферона на размножение II: 64—66
  - — как модельная система I: 329
  - парогриппа I: 94; II: 481, 482
  - передача от животного человеку I: 272—273; III: 434—435
  - — — человека человеку I: 269—271; III: 347—348, 353, 358—359, 370, 391, 403, 415, 433, 436
  - — членистоногими I: 271—272
  - повреждение клеток I: 286—289
  - подобные вирусу гепатита В (HBV-подобные вирусы) I: 330, 331, 339, 363, 407—410
  - — — — классификация I: 330—331
  - — — — структура генома I: 407
  - почкование (отпочковывание) I: 84, 86, 137, 460
  - проникновение в клетку I: 81, 105—106
  - — — организм хозяина I: 280—281
  - пути распространения I: 282—284
  - размножение I: 124—137
  - — и его последствия I: 125
  - — прикрепление к клетке I: 127—128
  - — проникновение в клетку I: 128



- — разделение I: 128—129
- — сборка, созревание и выход I: 136—137
- — требования и ограничения I: 129
- — экспрессия и репликация I: 130—136
- ретикулоэндотелиоза I: 439
- рода *Nairovirus* II: 387, 388
- саркомы и лейкоза птиц (ASLV) I: 439, 446, 449
- семейства Bunyaviridae, свойства II: 367
- с негативным геномом, репликация I: 132—133
- — сегментированным геномом I: 184, 197, 199, 205, 208, 219, 223
- спектр хозяев I: 124, 445—447
- способы обнаружения I: 265
- родство к клеткам и тканям I: 284—286
- таксономическое описание семейств I: 26—52
- топографические аспекты поведения I: 308—309
- условно-дефектные I: 148
- фаза созревания I: 126
- характеристики I: 24—25
- экзогенные I: 462, 463
- эндогенные I: 447—448, 462—463
- Вирусы-помощники I: 138—140, 143, 196, 443; II: 324
- Вирусы-сателлиты I: 146—148, 171, 172
- регуляция летальности I: 172
- транс-активация I: 147
- MSF-вирусы I: 447, 448
- Восприимчивость I: 124, 128

Гамма-герпесвирусы I: 337, 356, 406—407

Гастроэнтерит III: 11

Гексоны I: 79, 80, 81; III: 110, 111

Гемагглютинация I: 17

— белок наружного капсида  $\sigma$  I II: 303, 304—305

— диагностика реовирусной инфекции II: 319

Гемагглютинин I: 113, 114

— вируса гриппа I: 84, 93, 100—102, 104, 106, 255

— — антигенная структура I: 111—114

— — экспрессия гена в клетках II: 469, 470

— — — A, структура II: 455—458

— — — функции II: 453, 455

— реовируса типа 3 II: 304

— сравнение подтипов I: 114—116

Гемагглютинин—нейраминидаза (HN) вируса Сендай II: 454

— вирусов парагриппа II: 146

— прикрепление вируса к клетке II: 474

Геморрагическая лихорадка I: 272, 274

— — аргентинская I: 48, 274, 290

— — боливийская I: 48, 267; II: 393

— — корейская II: 392

— — крымская I: 273

— — с почечным синдромом II: 392

— — эпидемическая II: 392

Ген вирусный *онс* III: 353—354, 355

— гемагглютинина вируса гриппа III: 275

— дигидрофолатредуктазы (ДФР), селекция трансформированных клеток II: 157

— тимидинкиназы (*tk*-ген) II: 176; III: 210, 211, 212—213, 214, 216

— вируса простого герпеса (HSV) I: 249, 250, 255

— *Blym* I: 466

— *c-mos* I: 464, 470, 471

— *c-myc* I: 406, 464, 465, 466, 473, 474; III: 354

— *c-onc* I: 436, 470, 471

— *c-ras* I: 471, 473

— *c-src* I: 472

— *env* I: 441, 442, 443, 444, 458, 459, 461

— — продукт Pr90<sup>env</sup> I: 461

— *erb B*, продукт I: 472

— *gag* I: 440, 441, 442, 443, 444, 458, 460, 461, 472; III: 339, 340, 341, 343

— *pol* I: 440, 441, 442, 443, 458, 459

Генетика бактерий, бактериальные вирусы I: 13—14

Генетическая реактивация I: 209

— реассортация II: 468, 470

— рекомбинация II: 467—468

Генетические маркеры I: 184, 191

Генетическое картирование I: 219—220

Генная инженерия II: 38

Генноинженерные методы, создание плазмидных векторов II: 155

Генные продукты, синтез III: 204—205, 213—217

— — функция III: 211—213

Геном клетки-хозяина (клеточный геном) I: 217, 240, 248, 333, 363, 448, 451, 455

— SV40, механизм интеграции III: 55

Геномная библиотека человека II: 43

Геномы вирусные I: 138—175

- — дефектные, эволюция вируса и клетки-хозяина I: 172—174
- — картирование I: 219—223
- — кодирование I: 130
- — организация I: 130
- — репликация I: 130—136
- — транскрипция I: 132, 134, 135
- — экспрессия I: 130—136
- вирусов животных в качестве векторов I: 244—247
- — — геномные перестройки I: 254—255
- — — кодирование и организация I: 130
- — — открытые рамки считывания I: 378, 383
- ДНК-содержащих вирусов I: 130, 135—136
- моноклеточные I: 130
- Гены вирусные клонированные I: 241—244
- вирусов животных, временная экспрессия в эукариотических клетках I: 247—248
- — — интеграция с клеточным геномом I: 248—250
- — — конверсия клеток I: 170
- — — метод спасения маркера I: 241—243
- — — экспрессия в дрожжевых клетках I: 239—240
- — — — клетках млекопитающих I: 240
- — — — *Escherichia coli* I: 237—239
- иммунного ответа (Ig-гены) II: 8—9
- клеточные, онкогенез и трансформация I: 410, 411, 412, 413
- — трансформирующие I: 473—474
- — онс-гены (с-*onc*) I: 145—146, 216, 217, 436, 470, 471, 474
- конверсия I: 169—170
- модульная эволюция I: 172—174
- перенос и экспрессия I: 169—170
- репликация у ретровирусов I: 440—443
- ретровирусов *v-onc* I: 443—445, 468—470
- трансдукция от хозяина к хозяину I: 169
- функции I: 191—192
- экзогенные поверхностных вирусных антигенов II: 177
- МНС (главного комплекса гистосовместимости) II: 7—8
- PR-8 II: 172—173
- Гепаднавирусы III: 287, 315, 316—317
- Гепатит молниеносный III: 313
- В, ген поверхностного антигена III: 275
- — острый III: 309—314
- — хронический II: 104, III: 309—314
- Гепатоцеллюлярная карцинома III: 287
- Герпесвирус болезни Марека (MDV) III: 186
- лошадей типа 1 (EHV-1) I: 338—339, 403—404
- Люкке I: 361
- Герпесвирусы (вирусы герпеса) I: 20, 137, 167—168, 337—339, 356—362, 401—407; II: 58, 96; III: 186—227
- антирецепторы I: 127
- биологические свойства III: 187
- вирион III: 190—200
- вирусные белки III: 208—211
- геномы I: 135, 338; III: 206—208
- гликопротеины III: 19, 221—223
- ДИ-частицы I: 172
- ДНК I: 130; III: 192—198
- — репликация III: 217—218
- — созревание (процессинг) III: 219—220
- изменения клеточных мембран III: 225—227
- капсид вириона III: 190—192, 200, 202—203, 205
- классификация III: 189—190
- — ДНК-содержащих опухолеродных вирусов I: 330—332
- лошадей I: 358
- метаболизм клеточных макромолекул III: 223—224
- обезьян I: 361—362
- одевание и созревание I: 137
- подсемейство альфа-герпесвирусов I: 356, 401—404
- — бета-герпесвирусов I: 356, 404—405
- — гамма-герпесвирусов I: 356, 405—407
- полипептиды вириона III: 198—200
- проникновение в клетку I: 128
- развитие рака I: 337
- раздевание I: 129
- репликация III: 201—223
- синтез генных продуктов III: 204—205, 213—217
- структурные изменения в зараженных клетках III: 223
- тегумент III: 190, 191—192
- цикл репродукции I: 125—126
- экспрессия генов III: 204—206

- Гетерозиготность у вируса гриппа II: 470
- — вирусов животных I: 109—110
  - — парамиксовирусов II: 479
- Гибридизационный блок трансляции II: 42
- Гибридизация ДНК—ДНК III: 114, 136
- клеток, получение моноклональных антител I: 266
  - мРНК с кДНК I: 414—415
- Гибридные вирусы III: 162—163, 274—275
- Гиперпаратироз III: 437
- Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) I: 291; II: 6, 17, 21—23
- Гипотеза патогенеза дегенеративных заболеваний ЦНС III: 437—440
- прокапсиды II: 239, 240
  - трансфигурации II: 240
- Главные антигенные детерминанты защитных белков вирусов II: 152
- — у пикорнавирусов II: 210
- Главный комплекс гистосовместимости (МНС) II: 7—9, 14, 15, 16
- Гликопротеин оболочки, аминокислотная последовательность III: 342
- фузионный (F) II: 146
  - F<sub>0</sub> II: 454
  - fms I: 472
- Гликопротеины буньявирусов II: 372
- вируса гриппа I: 90, 103; II: 470, 471, 473
  - вирусные I: 84, 85, 87, 88, 91, 92—93, 94, 97, 98—99, 447
  - — мембранные I: 94, 95
  - — — антигенная структура I: 109
  - — — вакцины I: 116—117
  - — — выделение I: 95—98
  - — — гидрофобные свойства I: 95—96
  - — — иммунное распознавание I: 109
  - — — первичная структура I: 98—99
  - — — расщепление трипсином I: 103
  - — —  $\alpha$ -спирали I: 95
  - — — трансмембранный заякоривающий пептид I: 95
  - — — трехмерная структура I: 100—103
  - — — функции I: 103—117
  - — модификации II: 355—356
  - — созревание и транспорт II: 355—357
  - поксвирусов III: 19
  - регуляция транспорта II: 377
  - флeboвирусов II: 385
  - E1 и E2 коронавирусов III: 8—10, 18—19, 21
- Гломерулонефрит иммунокомплексный I: 293
- хронический II: 402
- Гуанидин, мутация резистентности к нему I: 204
- Гуанилатциклаза II: 69
- Гуанозинмонофосфат I: 249
- Гуморальные эффекторные механизмы II: 25—29
- Дансилкадаверин, ингибирование эндоцитоза II: 424
- Дельта-агент I: 147; III: 313—314
- Дельта-антиген I: 147, 273; III: 427
- Дефектные вирусные геномы I: 138—175
- — — биологическая роль I: 169—174
  - — — природа I: 138—148
  - — — эволюция вируса и клетки-хозяина I: 172—174
  - — — вирусы, определение I: 126—127
  - — — интерферирующие вирусы I: 138—144. См. также ДИ-геномы, ДИ-частицы
- Диабет ювенильный III: 436
- Диарея новорожденных, ротавирусы II: 262
- ДИ-геномы вируса леса Семлики I: 163
- — Сендай I: 159
  - — возможные механизмы образования I: 154—156
  - — модель репликативных ошибок типа обратного копирования I: 155
  - — мозаичная структура I: 161
  - — паповавирусов I: 165—166
  - — размеры I: 149
  - — с внутренними делециями, модель репликативных ошибок I: 156
  - — свободные неинтегрированные I: 172
  - — структуры I: 149—169
  - — участки, распознаваемые репликазой I: 149
- Димеры I: 63
- Дифференцировка, влияние интерферона II: 71
- ДИ-частицы аденовирусов III: 159—160
- биологическое значение I: 215
  - вируса гриппа II: 468, 469
  - дефектность I: 214—215
  - защита от болезни и гибели I: 171



- интерференция I: 152, 153, 210—211; II: 469
- как фактор регуляции летальности I: 171—172
- 5'-концевые РНК-последовательности I: 157—158
- мозаичного типа I: 153
- *ts*-мутанты I: 211, 212
- определение количества I: 143—144
- острая инфекция I: 171
- предохранение вирусных препаратов от контаминации I: 141—143
- репликация I: 151, 152, 154, 157, 158, 160
- — тогавирусов II: 360
- с внутренней делецией I: 152—153
- — коротким стволом I: 151—152
- синтез РНК рабдовирусов II: 430—433
- типа «застежка» или «шпилька» I: 152; II: 432, 433
- VSV простого делеционного типа II: 432
- — сложного делеционного типа II: 432, 433
- — типа «застежка» («шпилька») II: 432, 433
- — «сковорода с ручкой» II: 432, 433
- — типы структур РНК-генома I: 149—150
- ДНК аденовирусов, репликация III: 133—146
- — синтез III: 128
- — — *in vitro* III: 139—147
- — схема репликации III: 145
- — транскрипция *in vitro* III: 154—155
- библиотека кДНК I: 413—414
- вирусная в опухолях I: 408
- — длинные концевые повторы (LTR) I: 448
- — интеграция I: 455—457
- — клонированная I: 241, 243, 244; II: 154—157
- — синтез I: 435, 449, 452, 453—455
- — спасение маркера I: 241, 242, 243
- герпесвирусов, процессинг и сборка вирионов III: 219—221
- — репликация III: 217—218
- — цис-действующие последовательности III: 216
- клеточная, ингибирование синтеза при реовирусной инфекции II: 293
- — ингибиторы синтеза II: 223
- клеточные, синтез III: 116—117
- осаждение фосфатом кальция I: 240
- парвовирусов, репликация III: 75—82
- плазмидная, слияние бактериальных и эукариотических клеток I: 240
- поксвирусов, репликация III: 264—266
- после трансфекции I: 248
- рекомбинантная, технология II: 174
- рекомбинантные I: 241
- секвенирование I: 237
- трансфекция I: 240, 354
- эукариотическая III: 258
- SV40, синтез димеров-катенов III: 54
- — инициация, зависящая от большого Т-антигена III: 53
- — — механизм терминции III: 54
- Strong-stop ДНК I: 452, 454
- ДНК-геномы, спонтанные мутации I: 186—187
- ДНК-полимераза герпесвирусов III: 209, 210
- поксвирусов III: 258, 264, 265
- РНК-зависимая (ревертаза, обратная транскриптаза) I: 408, 433, 434—435, 451—452, 454
- ДНК-полимеразная активность частиц Дейна II: 104
- ДНК-содержащие вирусы I: 135—136, 165—169, 329—415. См. также Опухолеродные ДНК-содержащие вирусы
- — геномы I: 130, 135—136
- — — ДИ-частиц I: 165—169
- — делеционные мутанты II: 174—177
- — картирование I: 220—221
- — межтипичные скрещивания I: 205, 206
- — однохромосомные I: 207
- — рестрикционные эндонуклеазы I: 184
- — с линейной одноцепочечной ДНК I: 130, 135
- Идиотипы, теория сети II: 18—19
- Идоксуридин (ноддезоксуридин) II: 91, 94, 95, 113—114
- «Изоляты природные» I: 185
- Изометрические вирусы I: 56, 57
- Икосапептид II: 152, 153
- Иммортализация клеток I: 334, 335, 368, 372, 391, 411; III: 370, 371
- Иммунизация парентеральная II: 159

- противовирусная II: 145—178
- Иммунитет гуморальный I: 17, 290, 292
- двусторонняя система у фага P22 I: 173
- иммунные механизмы II: 147—149
- клеточный I: 17; II: 6, 13, 166, 305—307
- — влияние интерферона II: 119
- к суперинфекции фагом I: 169—170
- опосредованный слизистой оболочкой II: 149—150
- поверхностные антигены II: 145—147
- противовирусный I: 17
- системный II: 149, 150
- Иммунная система угнетенная II: 102—103
- Иммунные защитные механизмы II: 147—149, 360
- Иммунный ответ I: 289—294
  - — гуморальный III: 309
  - — клеточный III: 310, 311
  - — специфический II: 5, 6—21
  - — — индукция II: 6—21
- Иммуноаффинная хроматография, очистка интерферона II: 64
- Иммунодефицит, последствия II: 29—30
- Иммунокомплексные болезни II: 31
- Иммунология II: 5—6
  - вирусные инфекции I: 17
  - методы I: 17
- Иммуносорбционный ферментный анализ (ELISA) III: 367
- Иммуносупрессия I: 294, 295
- Индукторы интерферона, устойчивость к рибонуклеазе II: 49
- Интеграция вирусного генома с геномом клетки I: 217—218
- Интегрированные дефектные вирусные геномы I: 144—146
- Интеркалирующие агенты I: 188
- Интерлейкин 1 (ИЛ-1) II: 11
  - 2 (ИЛ-2) II: 13, 15, 20; III: 332
- Интерференция I: 139, 210—211
  - вирусная I: 447
  - гомологичная у вирусов животных I: 210—211
- Интерферон, блокирование II: 117
  - защита от вирусных инфекций I: 290
  - «иммунный» II: 116
  - комбинация с ацикловиром II: 105
  - комплексы с рецептором II: 56
  - лейкоцитарный II: 119, 121—122, 123, 125
  - лимфобластный II: 120
  - побочные нежелательные эффекты II: 73, 122
  - рекомбинантный II: 120
  - типа I II: 116
    - — II II: 116
  - фибробластный II: 94, 116, 120, 122
  - экзогенный как противовирусный агент II: 116, 123—127
- Интерфероновые мРНК II: 53—54
- Интерфероны II: 16, 35—73, 115—127
  - антивирусная (противовирусная) активность II: 35, 36, 56—66, 72, 117, 120—121
  - антивирусное состояние II: 57, 63, 66
  - антипролиферативная активность II: 41, 66—72, 119
  - антитела II: 55
  - биологическая активность II: 117
  - биологические эффекты II: 55
  - влияние на дифференцировку II: 71
    - — — иммунную систему II: 71
    - — — структурные компоненты клетки II: 70
    - — — функции клеток II: 37, 66, 67, 118—119
  - гены II: 38, 42—47
  - гипореактивность II: 117
  - ингибирующее действие на размножение клеток II: 67—68
  - индукторы II: 47—53, 127
    - — вирусная инфекция II: 47—49
    - — двухцепочечная РНК II: 49
    - — инактивированные вирусы II: 49—51
    - — метаболические активаторы (ингибиторы) II: 51—53
  - индукция II: 45, 48, 50, 51, 53, 54, 117
    - — антивирусного состояния II: 36, 38, 55, 56, 61, 63—64, 66, 115, 116
    - — гуанилатциклазы II: 69
    - — под влиянием реовирусов II: 307—308
    - — протеинкиназы II: 38, 62—63, 68—69, 118
    - — ферментов II: 68—69
    - — 2,5-oligo(A)-синтетазы II: 38, 61, 68—69, 118
  - как лимфокины II: 37, 72—73
  - классификация II: 39, 116
  - классические II: 116
  - клиническая фармакология II: 121—123
  - клиническое использование II: 72—73, 119—120, 123—127

- клонированные II: 73
- механизм антивирусного действия II: 37, 38
- очистка II: 36, 37, 54—55
- персистентные вирусные инфекции II: 38, 57, 442
- подавление размножения вирусов II: 36, 57—58
- — ретровирусов II: 65
- праймирование II: 53, 117
- природа II: 35, 39—42
- продуцирование II: 47—54
- противоопухолевое действие II: 68
- синтез белков II: 53, 68—69
- система 2,5-oligo(A) II: 59—62
- специфические клеточные рецепторы II: 55—56
- супериндукция II: 52, 117, 120
- сходство с гликопротеиновыми гомонами II: 70
- устойчивость клеточных линий II: 71—72
- характеристика II: 116—117
- циклогексимид II: 52
- человека, рекомбинантные гены II: 46—47
- — свойства II: 40
- — экспрессия клонированных генов II: 44—46
- Интроны I: 470; III: 121, 130
- Инфекции abortивные у коронавирусов III: 13
- верхних дыхательных путей, реовирусы II: 311, 312
- вирусные I: 10, 11
- — иммунопатология II: 30—32
- — медленные I: 294, 296—297
- — персистентные, развитие хронических и злокачественных заболеваний I: 172
- — респираторные II: 124
- — у человека, механизмы резистентности II: 29—32
- — факторы, влияющие на их развитие II: 91—92
- герпесвирусные, профилактика II: 125—126
- герпетические половых органов II: 92, 99, 102, 110—111
- — у больных с иммунодефицитом II: 108, 109—110
- латентные I: 294, 295, 297
- «ограниченные» II: 217
- персистентные I: 294, 297
- Инфекция abortивная I: 126, 445; II: 56, 217
- вирусная, активация клеточных онкогенов I: 466
- — вегетативная I: 14
- — иммунный ответ I: 289—294
- — инаппарантная I: 10, 11
- — индукция интерферона II: 47—48
- — ответ хозяина II: 5—32
- — развитие персистенции I: 171—172
- — эффективность заражения I: 449
- горизонтальная I: 447
- зоонозная I: 272—273
- латентная AAV III: 87—90
- модели I: 268—273
- начало I: 127—129, 278
- — восприимчивость клеток I: 124, 128
- — непермиссивная I: 445
- — ограниченная I: 126, 127
- — персистентная I: 174, 218—219
- — герпесвирусами I: 295
- — ДИ-частицы II: 360, 442
- — иммуносупрессия I: 295
- — клеточные мутации I: 218; II: 309—310
- — «кризис» II: 360
- — мутации в сегментах дцРНК II: 308—310
- — поддержание в культуре клеток I: 296
- — развитие I: 295
- — реовирусная II: 308—310
- — — схема развития II: 310
- — — хлорид аммония II: 310
- — — цитопатический эффект II: 309
- — состояние иммунодефицита I: 294
- — прикрепление вируса I: 127—128
- — продуктивная I: 126, 332—333, 366
- — проникновение вируса в клетку I: 128
- — раздевание вируса I: 128—129
- — реовирусная, поражение печени II: 315
- — рестриктивная I: 127
- — субклиническая папилломавирусная (СПИ) I: 351—352
- — хроническая I: 293, 434, 437
- Искусственные пустые частицы (ИПЧ) II: 236
- Искусственный верхний компонент (ИВК) II: 236
- Капсиды, сборка у пикорнавирусов II: 234
- Капсомер(ы) I: 63; II: 267, 269
- Кардиовирусы II: 193, 218, 221, 222, 223



- Картирование вирусных геномов I: 219—223  
 — — карты обмена сегментами I: 219—220  
 — — рекомбинационные карты I: 219  
 — — рестрикционные карты I: 220—221  
 — — транскрипционные карты I: 222  
 — — трансляционные карты I: 223  
 — — физические карты I: 221—222  
 — геномов аденовирусов III: 120—121, 149, 155—156, 164—165  
 — РНК, «олигонуклеотидные отпечатки пальцев» I: 267  
 Карцинома Люкке I: 337  
 — первичная гепатоцеллюлярная (гепатомы) III: 307—308, 309, 314—317  
 Кератит герпетический у кроликов II: 91, 105  
 Кератиты герпетические II: 99—100  
 — — применение интерферона II: 124  
 — — эпителиальные II: 113  
 Кератоконъюнктивиты эпидемические (ЭКК) III: 103  
 — — применение интерферона II: 124  
 Киллеры естественные (НК), влияние интерферонов II: 19—20  
 — — неспецифическая иммунная защита II: 5, 20  
 — — развитие иммунитета I: 290, 292  
 — — цитотоксическая активность II: 19—20  
 Клетка-хозяин, воздействие пикорна-вирусов II: 222—229  
 — — тогавирусов II: 359—360  
 — и вирусы, взаимодействие I: 215—219  
 — метаболизм I: 286—287  
 — — при заражении рабдовирусами II: 439—441  
 — подавление синтеза белков II: 226—227  
 — синтез белков I: 286  
 — эволюция I: 172, 175  
 В-клетка, рецептор для антигена II: 17  
 Клетки кишечных микроскладок (М-клетки) I: 281  
 — линии РСС4 III: 43, 44  
 — почки новорожденного хомячка (ВНК) II: 344  
 — «социальное поведение» III: 226  
 — с трисомией по хромосоме 21, рецептор интерферона II: 56  
 — эритролейкоза Френд II: 71—72  
 — яичников китайского хомячка (СНО) II: 435  
 — — — дефектные по ДГФР II: 157  
 — COS I: 244  
 — L мутантные (линия LR) II: 309—310  
 В-клетки, дифференцировка II: 17  
 — синтез иммуноглобулинов II: 6, 17—18  
 — трансформированные II: 24  
 М-клетки I: 281  
 Т-клетки II: 6—7, 16, 23, 24, 30, 305; III: 332—333, 334, 344, 347, 349, 354, 358  
 — активированные, поверхностные антигены III: 333  
 — иммунные функции III: 356—358  
 — цитотоксические (Тс-клетки) II: 12, 14—16, 23—25, 146, 147, 148, 149, 150  
 Тd-клетки II: 22, 160  
 Клеточная архитектура, связь с метаболизмом вирусов I: 307—325  
 — линия лимфобластов Namalva, геном вируса Эпштейна—Барр II: 120  
 — — МО III: 336—337  
 — пролиферация, воздействие интерферонов II: 119  
 Клеточные мембраны, воздействие герпесвирусов III: 225—227  
 — структуры и метаболизм вирусов I: 313, 315  
 — эффекторные механизмы II: 19—21  
 В-клеточные линии перевиваемые II: 24  
 В-клеточный ответ II: 9, 17—18  
 Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых (ТЛВ) III: 333, 336, 337, 342, 343, 344—345, 347, 355  
 — — — горизонтальное распространение ретровирусов III: 370  
 — лейкоз Сезари III: 344, 345  
 — ответ, индукция II: 11—13  
 — — пролиферативный II: 13  
 — фактор роста (ТКФР), рецепторы I: 254; II: 13; III: 332—333, 334, 345, 352, 354  
 Клонирование вирусных структурных генов I: 224  
 — рекомбинантных ДНК I: 235—237  
 Ковалентные связи, разрыв и восстановление I: 196  
 Колифаг р2 I: 147  
 — р4 I: 147

- Комплемент, альтернативный (амплификационный) путь активации II: 26, 27, 28, 29
- классический путь активации II: 26, 27, 28
  - лизис клеток II: 28
  - нейтрализация вирусов антителами II: 27
- Комплементационный тест (тест на комплементацию) I: 193, 194
- Комплементация I: 193—196
- аллельная (внутригенная) I: 194
  - асимметричная (односторонняя) I: 194
  - индекс I: 193
  - неаллельная (межгенная) I: 194
- Конверсии I: 145
- Конверсия лизогенная I: 169
- Кондиломы, папилломавирусы человека I: 351
- Коревая энцефалопатия II: 127
- Коронавирусы III: 5—23
- абортивные инфекции III: 13
  - гликопротеин E1 III: 8—9, 18, 19, 21
  - E2 III: 9—10, 13, 18—19, 21
  - животных III: 10
  - нуклеокапсиды III: 8, 20, 21
  - общая характеристика III: 5—7
  - почкование III: 20—21
  - природные хозяева III: 6
  - размножение III: 11—13
  - репликация III: 13—22
  - синтез минус-цепи РНК III: 16
  - — плюс-цепи РНК III: 16—17
  - РНК-зависимая РНК-полимераза III: 17
  - сборка вирионов III: 20—22
  - свойства I: 40—41; III: 6
  - синтез геномной РНК III: 16—17
  - — структурных и неструктурных белков III: 17—19
  - структура вирионов III: 7—10
  - тропность III: 13
  - функции гликопротеинов III: 9
  - человека III: 10—11
- Корь I: 293, 297
- Краснуха врожденная, лечение интерфероном II: 126
- Кросс-реактивация I: 209
- Куру I: 296; III: 383, 389, 390—411, 427, 429, 431, 432, 437, 439
- аутоиммунные антитела III: 427, 429
  - генетическая гипотеза III: 407
  - изменения в нервной системе III: 398—401
  - инкубационный период III: 391, 402, 408, 409
  - клиническое течение III: 392—398
  - конечная стадия III: 397—398
  - механизм распространения III: 403
  - общая характеристика III: 390—391
  - происхождение III: 431—432
  - распространение III: 431—432
  - сидячая стадия III: 397
  - смертность III: 394, 396, 398, 402
  - способы передачи III: 404—405, 407—409, 410
  - сходство со скреппи III: 407
  - у шимпанзе III: 406, 407, 408
  - фибриллы, связанные со скреппи (ФСС) III: 387, 427, 439
  - ходячая стадия III: 392—397
  - эпидемиология III: 402—403
  - этиология III: 406—411
- Кэпирование нуклеотидов II: 118
- мРНК реовирусов II: 281—282
- «Кэпирование» (кэпинг), перераспределение поверхностных компонентов II: 70, 301
- Кэпирующие ферменты реовирусов II: 281—282
- Кэп-связывающий белок, инактивация при вирусной инфекции I: 286
- комплекс (КСК) II: 226
  - фактор II: 226
- Кэп-структура на мРНК клетки-хозяина I: 286
- Латентные инфекции I: 294, 295, 297; III: 87—90
- Лейкоз кур I: 434
- лимфоидный острый II: 127
- Лейкозные вирусы I: 216
- Лейкоцитарный интерферон II: 124, 125
- Лейкоэнцефалит прогрессирующий очаговый I: 16
- Лейкоэнцефалопатия прогрессирующая очаговая (ПОЛ) I: 297, 344
- Лентивирусы I: 437
- «Лидерная» последовательность I: 92
- Лизис зараженных вирусом клеток II: 28—29
- Лизогения I: 14, 144
- Лизогенная конверсия I: 169
- Лизогенные вирусы I: 144—145
- фаги I: 145
- Лимфатический путь, распространение вирусов I: 282
- Лимфобластный интерферон II: 120
- Лимфобластоидные клет II: 52
- линии клеток II: 47

- Лимфокины I: 290; II: 13, 72; III: 352  
 Лимфома Беркита, роль вируса Эпштейна—Барр I: 337, 359, 405, 406, 411  
 — Ходжкина I: 350  
 Лимфомы В-клеточные человека I: 473  
 В-лимфомы кур I: 464, 465, 466  
 Т-лимфосаркоматозный лейкоз III: 334  
 Лимфоцитарный хориоменингит (ЛСМ) I: 171, 283, 293  
 Лимфоциты II: 6; III: 189  
 — больных гепатитом В III: 310  
 — большие гранулярные (БГЛ) II: 19  
 — взаимодействие с реовирусами II: 305  
 — периферической крови человека (ЛПК) II: 19, 20, 21, 23  
 В-лимфоциты III: 189, 350, 364  
 Т-лимфоциты II: 6, 14, 116; III: 189  
 — иммунные I: 291  
 — цитолитические (ЦТЛ) I: 291  
 — цитотоксические II: 8, 14—16, 305—306, 402  
 — человека III: 334, 344, 349, 350—352  
 Т-лимфоциты-супрессоры I: 291  
 Литический цикл репликации I: 286; III: 40, 117—118  
 Лишай опоясывающий, видарабин II: 102—103  
 Макрофаги, вирусная инфекция I: 289, 292  
 — гиперчувствительность замедленного типа II: 21—22  
 — презентация антигена II: 10—11  
 — развитие иммунитета I: 290  
 — фактор активации макрофагов (ФАМ) II: 72  
 — торможения миграции макрофагов (ФТМ) II: 22  
 Маргинация хроматина II: 225  
 Метаболизм вирусов, архитектурные аспекты I: 324—325  
 — и клеточные структуры I: 313—315  
 Метилхолантрен I: 414  
 Метилхолантренэпоксид I: 414  
 Метисазон (N-метилизатин-β-тиосемикарбазон) II: 131  
 Механизм внедрения, упаковка вирусной РНК II: 239—240  
 — разрыв — воссоединение I: 197, 198, 201, 207, 209  
 Микротрубочки, взаимодействие с аденовирусом I: 322—323  
 Миксовирусы I: 20, 84, 87  
 — белки нуклеокапсида II: 453  
 — — оболочки II: 453—454  
 — гемагглютинин II: 146  
 — группы II: 446—447  
 — морфология II: 448—451  
 — нуклеокапсиды II: 448  
 — обзор II: 447—454  
 — организация генома II: 451—453  
 — подавление размножения II: 58  
 — функции II: 454  
 Миссенс-мутации II: 169—171  
 Молекулярное клонирование ДНК вируса гепатита в (HBV) III: 298  
 Моноуклеоз I: 270, 359, 369  
 Моноцистронные мРНК I: 129, 132, 133; II: 428  
 Moskitная лихорадка I: 274  
 Мультиплоидные вирусные частицы I: 210  
 Мутагенез вирусных ДНК in vitro I: 250—256  
 — инсерционный, индуцированный вирусом I: 464—465  
 — сайт-специфический I: 253; III: 163, 164, 212  
 — — рестрикционные эндонуклеазы I: 224—225, 253—254  
 — — синтетический олигонуклеотид I: 254  
 — специфических последовательностей ДНК in vitro I: 250  
 — спонтанный I: 186  
 — — скорости I: 186  
 Мутагены I: 187—188  
 — кривая зависимости действия от дозы I: 187  
 Мутант, определение I: 185—186  
 Мутанты аденовирусов по кругу хозяев (*hr*-мутанты) III: 163—164, 165, 274  
 — — температурочувствительные III: 104, 165—166  
 — — условно-летальные III: 163  
 — герпесвирусов III: 208, 209  
 — — условно-летальные III: 208, 211—212  
 — делеционные I: 191, 195; II: 174, 175, 177, 178, 468  
 — — вирусов животных I: 251—253  
 — — реовирусов II: 308—310, 324  
 — по морфологии бляшек I: 189  
 — — спектру хозяев I: 189; II: 469  
 — синцитиальные (*syn*-мутанты) I: 189; III: 226  
 — с подвижным линкером I: 252  
 — температурочувствительные (*ts*-



- мутанты) I: 189—190; II: 469; III: 266, 267
- типы I: 188—191
- условно-летального типа I: 197
- условно-летальные III: 208, 211—212, 273—274
- устойчивые к ингибиторам III: 274
- холодоадаптированные (*са*-мутанты) II: 170, 171, 469
- холодочувствительные (*с**s*-мутанты) I: 190
- цитотоксичные I: 399
- Мутации делеционные II: 174
- клеток L при персистентной инфекции II: 309
- определяющие спектр хозяев (*h**g*) II: 172
- резистентные к моноклональным антителам (*ma*-мутации) I: 256
- точечные у вирусов животных I: 253—254
- Мутация плейотропная I: 192
- резистентности к гуанидину I: 204
- Мышцы, некротический миозит II: 317
- Наиовирусы, гликопротеины II: 388
- нуклеокапсиды II: 388—389
- передача II: 369
- размеры белков и РНК II: 370
- родовые свойства II: 388—389
- серологическая классификация II: 388
- Налоксон, побочные эффекты интерферонов II: 73
- Неаллельная (межгенная) комплементация I: 194
- Негативные бляшки, определение количества ДИ-частиц I: 143
- Негативный геном РНК-содержащих вирусов I: 150, 156, 159; II: 425, 475
- Негенетическая реактивация III: 248
- Нейраминидаза (NA) вируса гриппа I: 84, 100, 102—103, 117, 287, 288; II: 453, 469, 470, 471—473
- — — активный центр I: 102, 103
- — — антигенная структура I: 117
- — — как фактор нейровирулентности I: 287—288
- — — каталитический центр II: 472, 473
- — — первичная структура II: 471, 472
- ортомиксовирусов и парамиксовирусов, связывание с клетками I: 128
- пикорнавирусов, разрушение рецепторов для вирусов II: 218
- Нейровирулентность II: 228—229
- Нейронный путь, распространение вируса бешенства I: 282—283
- Нейроны, рецепторы вирусного геммагглютинина I: 285
- Нейрофибрилярные сплетения (НФС) III: 387, 437, 439, 440
- (10 nm)-нейрофиламенты III: 387, 409, 417, 438, 440
- Нейтрализация вирусов антителами, влияние комплемента II: 27
- — — серотипоспецифическая II: 304
- Некроз коры головного мозга II: 313
- Некротический миозит II: 301, 317
- Неонатальная диссеминация II: 95
- Непермиссивная инфекция I: 445
- Непермиссивные клетки I: 126
- Нефропатия эпидемическая II: 392
- Новые вирусы, происхождение I: 273—276
- Нуклеиновые кислоты, электрофоретическая подвижность I: 204
- Нуклеозидтрифосфат-фосфогидролаза (нуклеотидфосфогидролаза) II: 280, 282
- Нуклеоид I: 408, 409, 436; III: 248, 249
- Нуклеокапсид I: 55, 56, 81, 84, 89, 129, 137, 157, 318, 319; II: 258, 353, 357, 371, 388, 390, 419; III: 9, 191, 299
- белки I: 318
- белок N I: 157—158
- вируса везикулярного стоматита (VSV) I: 75; II: 420
- — герпеса (герпесвируса) I: 137; III: 191
- — леса Семлики I: 87
- — Сендай, белки L, P и NP II: 453
- спиральный I: 157; II: 419, 447
- Нуклеокапсиды буньявирусов II: 369, 372
- внутренние аренавирусов II: 394—395
- миксовирусов II: 448
- нитевидные I: 56
- сборка вирионов I: 137
- тогавирусов II: 357—358
- флeboвирусов II: 385
- Нуклеотидные последовательности II: 202, 461; III: 260
- Ньюкаслская болезнь II: 475
- Обезьяний вирус 40 см. Вирус SV40
- — В II: 106
- Оболочки вирусные I: 86—92
- — слияние с клеточной мембраной I: 86, 105—109

- Олигонуклеотиды у реовирусов II: 274—275
- Олигосахаридные цепи гликопротеинов II: 355
- Олигосахариды, процессинг II: 356
- Онковирусы, вид-хозяин I: 439
- классификация I: 437—439
- морфология и морфогенез I: 439
- — С-типа I: 440
- Онкоген вирусный *v-myb* I: 471
- — *v-myc* I: 405, 411
- клеточный *c-myc* I: 405, 411, 464, 466
- Онкогенез I: 410—413
- Онкогенные РНК-содержащие вирусы I: 433. См. также Онковирусы и Ретровирусы
- Онкогенсодержащие ретровирусы I: 468
- Онкогены вирусные I: 14, 216, 470
- классы I: 472—473
- клеточные I: 15, 145—146, 340, 411, 412, 436, 466, 470, 472, 473—474
- — *c-ras* I: 471
- ретровирусов I: 410, 411, 435, 443—444, 465, 468, 469
- lac*-Оперон, промоторы I: 238—239
- Опоясывающий лишай, вирус ветряной оспы I: 270—271
- — диссеминированная форма II: 94
- — угнетение иммунной системы I: 270; II: 92
- Опухолеродные вирусы I: 268, 329—330
- — влияние интерферона на размножение II: 64—66
- — ДНК-содержащие, активация клеточных генов I: 413
- — — влияние интерферона на вирус SV40 II: 58, 59, 62, 64—65. См. также Вирус SV40
- — — классификация I: 330—332
- — — природный и экспериментальный онкогенез I: 341—363
- — — пути онкогенеза I: 410—415
- — — размер генома I: 333
- — — семейства I: 330—331
- — — свойства I: 332—333
- — — трансформация клеток I: 333—334, 336, 338, 341, 345, 363, 368, 371, 376, 389—392, 395, 397, 403—407, 410, 412
- — — трансформированные клетки I: 333, 335, 337, 342—343, 350, 354, 364, 367, 371, 377, 390, 396, 402, 413
- — — трансформирующие гены I: 333, 336, 340—341, 354, 365, 387, 407, 410—413
- — — функция иммортализации I: 412
- Опухоли, ассоциируемые с вирусами I: 268
- вирусные онкогены I: 14
- индукция вирусами I: 14, 329
- Орбивирусы II: 258, 262, 267
- белки II: 259
- вирулентность II: 260
- геном II: 259—260
- заболевания у животных II: 262
- репликация II: 260—262
- структура II: 258—259
- физико-химические свойства II: 259
- Ортомиксовирусы II: 446—473
- актиномицин D II: 459, 463
- антирецептор I: 127
- белки Р II: 480—482
- геномная РНК I: 132
- нуклеокапсид вируса гриппа II: 470—471
- организация генома II: 451—453
- проникновение в клетку I: 128
- размножение I: 133
- репликация II: 455—473
- сравнение с парамиксовирусами II: 447—454
- Ортопоксвирусы III: 248, 261, 264
- Ортореовирусы II: 257, 258
- белок  $\lambda 3$  II: 261
- геном II: 259
- мРНК II: 260
- сборка II: 261
- связывание с клеткой II: 260
- структура II: 258—259
- транскрипция II: 261
- эндосомы II: 260
- Остеогенная саркома, применение интерферона II: 38
- Тс-ответ II: 15, 159—160
- Пакамицин, построение карты генома вируса полиомиелита I: 184, 223
- «Пакамициновое картирование» I: 223
- Панэнцефалит подострый склерозирующий (ПСПЭ) I: 16, 297; II: 31, 127; III: 431, 438
- Папилломавирусы I: 330, 331, 333, 336, 345—352, 376—384
- геном I: 333, 345
- животных I: 346—348
- крупного рогатого скота (BPV) I: 245, 347, 376, 378, 379—381, 383—384

- — — — челночные векторы I: 336, 379
- — — — экспрессия генома I: 379
- образование опухолей I: 345, 346—347, 348—349
- репликация I: 336, 345
- ДНК I: 377—379
- свойства I: 333, 345—346
- трансформация клеток I: 345
- человека I: 348—352
- нуклеотидные последовательности ДНК I: 383—384
- развитие рака I: 349—352
- экспрессия геномов I: 381—383
- Папилломатоз гортани I: 352
- Папилломы I: 346, 348, 349, 351, 352
- человека I: 348—352
- Паповавирусы I: 77—79, 165—166; III: 30—57. *См. также* Полиомавирусы и Вирус SV40
- геном I: 125, 135
- ДИ-геномы I: 165—166
- ДНК I: 55, 77, 79
- клонированные геномы I: 241
- кольцевые геномы, точечные мутации I: 253
- нуклеосомы I: 55, 79
- раздевание I: 129
- сборка и созревание I: 136
- Парамиксовирусы, антигены II: 447, 459
- белки оболочки II: 453
- вирус-индуцированное слияние II: 481
- геном II: 450, 451—452
- геномная РНК I: 132
- гетерозиготность II: 479
- морфология II: 448
- нейраминидаза I: 128
- нуклеокапсиды II: 448
- проникновение в клетку I: 128
- протеолитическое расщепление белка F I: 285
- распределение функций между гликопротеинами II: 454
- репликация II: 473—481
- генетические взаимодействия II: 478—480
- гликопротеин F II: 474
- РНК II: 477—478
- транскрипция и трансляция II: 475—477
- сборка вирионов II: 480—481
- фенотипическое смешивание II: 479
- ферменты синтеза РНК II: 453
- Парвовирусы III: 67—96. *См. также* Адено-ассоциированные вирусы
- автономные III: 73, 74
- репликация ДНК III: 78—79, 80—81
- синтез РНК III: 83—84
- геном III: 69—72
- репликация ДНК III: 75—82
- Паркинсонизм III: 427
- Патогенез вирусных инфекций I: 277—298
- — — общие принципы I: 278—280
- — — распространение вируса I: 282—284
- реовирусов II: 294—310
- Пейеровские бляшки I: 281
- Пентоны I: 79, 80; III: 110, 111
- Пепломеры у тогавирусов II: 345
- Пептид(ы) заякоривающий(е) I: 95, 96, 99
- сигнальный I: 92, 93
- Перитонит II: 317
- Пермиссивность клеток, отличие от восприимчивости I: 128
- Пермиссивные клетки I: 126, 127; III: 203
- Пикорнавирусы I: 74, 130, 136, 162—163; II: 190—241
- антигенная трансформация N—H II: 236—237
- антигенные участки II: 209
- антирецепторы II: 208, 220, 221
- вирион II: 199—207
- воздействие на клетку-хозяина II: 222—228
- — — метаболизм макромолекул II: 222, 224
- генетическая рекомбинация II: 198—199
- геном II: 194, 195, 196, 197, 202, 223, 229
- — свойства РНК II: 195
- синтез РНК II: 229—231
- — структура РНК II: 194—198
- делеционные мутанты II: 177
- ДИ-частицы I: 162—163
- капсид II: 202, 208
- классификация II: 191—194
- клеточные рецепторы II: 211, 217, 218—219, 222
- молекулярная биология II: 190—191
- морфогенез II: 233—240
- нейровирулентность II: 228—229
- протомер II: 201—202, 208—211
- репликация генома I: 125
- серотипы II: 209
- синтез белков клетки-хозяина II: 226—227
- — клеточной РНК II: 225—226



- физические свойства II: 193—194
- цикл размножения II: 211—214
- репродукции I: 126
- Плазматические мембраны клетки, влияние интерферонов II: 70
- Плазмидная ДНК, слияние бактериальных и эукариотических клеток I: 240
- Плеоморфизм II: 448
- Повреждения клеток II: 308
- Позитивный геном РНК-содержащих вирусов I: 130—132
- Поксвирусы I: 20, 127, 130, 135, 136, 168, 241—242, 246; II: 96, 131; III: 246—275
  - антирецепторы I: 127
  - геном III: 253—256, 264
  - ДНК I: 130, 135, 241—242, 246
  - ДНК-геном I: 246
  - классификация III: 246—248
  - мутанты, устойчивые к ингибиторам III: 274
  - мутации III: 273—274
  - отсутствие сплайсинга III: 258
  - поздняя транскрипция III: 266—268
  - полипептиды III: 250—251
  - раздевание I: 129
  - ранняя транскрипция III: 257—260
  - репликативный цикл III: 256—272
  - РНК-полимераза III: 251, 258
  - сборка и созревание I: 136
  - синтез белка III: 272—273
  - тимидинкиназа III: 261
  - ферменты III: 251—253
  - химический состав III: 249—250
  - цитоплазматические центры репликации ДНК III: 264
- Поликарпионы (синцитий) II: 481; III: 363
- Поликарпициты III: 225
- Полимераза, образование дефектного интерферирующего вируса I: 211
  - «прыжки» I: 163
- Полиомиозит III: 436
- Полиморфизм вирусов III: 366—367
- Полинуклеотидлигаза III: 264
- Полинуклеотид-пирофосфатазная активность II: 282
- Полновакцина II: 26
- Полиовирус I: 315—318. *См. также* Вирус полиомиелита
  - процессинг белка I: 315
- Полиомавирусы I: 77, 78, 330, 331, 334—335, 343—344, 366—376. *См. также* Вирус полиомы мышей и Вирус SV40
  - большой Т-антиген I: 334, 335, 367, 368—373, 376
  - животных I: 343—344
  - малый Т-антиген I: 334, 335, 368, 370—373, 376
  - организация и экспрессия трансформирующих генов I: 366—368
  - свойства I: 332, 333
  - средний Т-антиген I: 335, 368, 370—375
  - трансформация I: 333, 344, 364, 366
  - человека I: 344
- Полиомиелит II: 29, 151, 217, 236
- Полиплоидия II: 448, 470
- Полипротеин, расщепление II: 197, 211, 231—233
  - синтез II: 211, 231—233
  - слитный *gag-pol* I: 459
- Полирибонуклеотиды двухцепочечные синтетические как индукторы интерферона II: 49
- Последовательность ТАТА I: 252
- Посттранскрипционный контроль III: 216
- Почкование I: 84, 86, 137, 460; II: 65, 358—359, 394, 401; III: 20—21
- Праймер пептидный II: 154
- Праймирование II: 53, 117
- Природные пустые капсиды (ППК) II: 236
  - — — сборка II: 237
  - — — типы II: 240
- Природный верхний компонент II: 236
- Провирионы II: 239
- Провирусная гипотеза I: 435
- Провирусы I: 435, 455—457, 458
  - лейкоза мышей Молони (Mo-MuLV) I: 463, 464
  - свободные линейные ДНК I: 456, 457
  - эндогенные I: 447, 462—463
- Прокапсид I: 136
- Промотор транскрипции I: 238
  - *tac* I: 238, 239
- trp*-Промотор I: 238
- Протеинкиназа I: 374—375
  - индукция интерферонами II: 62—63, 69
- Противовирусная активность, определение *in vitro* II: 90
  - терапия клиническая II: 92—95
  - — — специфическая диагностика II: 92—93
  - химиотерапия II: 89—132
- Противовирусные препараты II: 89—91
  - — — механизмы действия II: 89—90

- — модели для испытания на животных II: 91
- — разрешенные в настоящее время II: 95
- — токсичность II: 94
- «Прыгающие репликазные комплексы» I: 154, 156
- Псевдовироны I: 148
- «Псевдореверсия», возможный механизм II: 323
- Псевдоревертант I: 211, 212; II: 321, 323
- Псевдотипы I: 441; II: 479
- обнаружение I: 75
- образование I: 214
- Пуромицин II: 218
- Рабдовирусы**, G-белок, II: 423, 426, 436, 437, 438
- L-белок II: 422, 426, 429, 434, 436
- M-белок II: 422, 426, 437, 438, 439
- N-белок II: 422, 426, 429, 430, 434, 435, 438
- NS-белок II: 422, 426, 427, 429, 430, 434, 435
- выключение синтеза хозяйских белков II: 441
- — — РНК и ДНК II: 440—441
- геном II: 418, 427
- геномная РНК I: 132; II: 418, 426
- гликопротеин II: 422—423, 436
- делеционные мутанты II: 420
- дефектные интерферирующие частицы (ДИ-частицы) II: 420—421, 430, 431, 432—433
- классификация II: 418, 419
- лидерная РНК II: 425—426, 440
- метаболизм клетки-хозяина II: 439—441
- *ts*-мутанты II: 422, 429, 430, 438, 440, 442
- персистентная инфекция II: 441—443
- подавление размножения интерфероном II: 58
- регуляция синтеза РНК II: 429
- репликация II: 428—432
- рибонуклеокапсид II: 418
- рибонуклеопротеин (РНП) II: 419, 434, 435
- мРНК II: 425, 426, 434
- РНК-зависимая РНК-полимераза II: 418, 419
- сборка вирионов II: 438—439
- структура II: 418—419
- транскрипция II: 425
- трансляция вирусных мРНК II: 441
- эндоцитоз II: 424
- — опосредованный рецепторами II: 424
- Радиоиммунный анализ I: 17
- Размножение вирусов, фаза созревания I: 126
- — — эклипсная I: 126
- клеток, ингибирующее действие интерферонов II: 37—38, 67—68
- пикорнавирусов, латентный период (эклипс-фаза) II: 213
- — экспоненциальная фаза II: 213
- Рак мочеполовых путей человека I: 336, 350—351
- носоглотки I: 337, 359
- первичный гепатоцеллюлярный I: 339, 363
- роль аденовирусов I: 355
- — герпесвирусов I: 337
- — папилломавирусов I: 348, 349—352
- шейки матки I: 338, 348, 349, 351, 357, 358, 359
- Раковая опухоль предстательной железы I: 359
- «Распознающие сигнал частицы» (РСЧ) I: 93
- Реактивация генетическая I: 209
- негенетическая III: 248
- Реассортантные вирусы гриппа А II: 170
- Реассортанты II: 170, 171, 172, 173
- буньявирусов II: 379
- генетические I: 280, 281
- межтипные II: 385
- реовирусов II: 304, 316, 325—326
- сегменты геномной РНК II: 321
- PR-8 аттенуированные II: 173
- Реассортация генов II: 170, 172—173
- геномов реовирусов II: 324—325
- между дефектными и инфекционными вирусами I: 173
- перемешивание сегментов генома I: 196
- Реверсия I: 188, 211—212; II: 323
- интрагенная II: 323
- экстрагенная II: 323
- Ревертанты *ts*-мутантов реовируса I: 212
- Регуляция на уровне трансляции III: 216—217, 267
- транскрипции III: 267
- Рекомбинанты I: 198, 209
- дикого типа I: 197—198
- Рекомбинационные карты I: 219
- Рекомбинация I: 196—209
- внутримолекулярная I: 196, 197, 207—208
- внутрисегментная (генная) II: 468

- индекс I: 198
- механизмы I: 207—209
- незаконная I: 217
- по типу «все или ничего» I: 197, 199
- — механизму разрыв — воссоединение I: 196, 197, 198, 201, 207
- у буньявирусов II: 373, 378, 380
- — вируса гриппа II: 467, 468
- — вирусов с сегментированным геном I: 197, 208—209
- — парамиксовирусов II: 478
- — ретровирусов I: 463—464
- — флсбовирусов II: 386
- in vitro I: 242
- Реовирусная инфекция I: 129, 287
- — диагностика II: 318—319
- Реовирусы I: 136, 164, 284—285; II: 257—262, 265—326
- белки II: 259, 269, 275—280
- — наружного капсида II: 276—279
- — сердцевины II: 279
- взаимодействие с лимфоцитами II: 305—307
- гемагглютинация II: 283
- двухпочечная РНК (дцРНК) II: 266—267, 272—274, 280, 281, 287, 289, 291, 309
- двухпочечный сегментированный геном I: 134—135
- заболевания животных II: 311—317
- — человека II: 310—311
- изменения клеточного метаболизма II: 293—294
- инактивация II: 284
- интерференция II: 321, 323
- классификация II: 267—269
- комплементация II: 321
- круг хозяев II: 262
- кэпированные мРНК II: 282, 289
- кэпирующие ферменты II: 281—282
- молекулярная эпидемиология II: 320
- морфология II: 269—270
- мутанты делеционные II: 308, 324
- — прототипные I: 201
- — с измененной тропностью к ЦНС II: 165
- ts-мутанты II: 307, 321, 429
- некротический миозит II: 301
- образование включений в клетках II: 291—293
- однопочечная РНК (оцРНК) II: 274—275, 291
- олигонуклеотиды II: 274—275
- очистка II: 283—284
- патогенез II: 294—310
- — белок  $\sigma 1$  II: 299
- — генетика распространения инфекции II: 298
- — гуморальный иммунный ответ II: 303—305
- — изменения и повреждения клеток II: 291—293, 301, 308
- — интерферон II: 307—308
- — клеточная и тканевая тропность II: 299—303
- — клеточный иммунитет II: 305—307
- — персистентная инфекция II: 308—310
- — пути распространения инфекции II: 297—298
- повреждение поджелудочной железы II: 315—316
- — селезенки II: 315
- — миокарда II: 314
- проникновение в клетку II: 285—286
- — организм хозяина I: 280—281
- птиц II: 268
- разделение I: 129; II: 286
- размножение I: 134
- реассортанты II: 325—326
- реассортация геномов II: 324—325
- реверсия II: 323
- рентгеноструктурный анализ РНК II: 277
- репликация II: 260—262, 284—294
- рецептор для связывания на лимфоцитах II: 301
- сборка, созревание и выход из клетки I: 136; II: 290—291
- свойства II: 258
- сегментированный геном I: 130, 134; II: 259—260, 266, 267
- серотипспецифическая гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) II: 306
- серотипспецифические Т-супрессоры II: 306
- синдром карликовости II: 301
- структура II: 258—259
- супрессия I: 212—213
- транскриптаза II: 280—281
- транскрипция II: 286—289
- трансляция II: 289—290
- ферментативные активности II: 280—282
- физико-химические свойства II: 259, 267, 271—272
- цитопатический эффект II: 282, 318
- чувствительность к физическим и



- химическим воздействиям II: 271—272
- Репликаза, модель «обратного копирования» I: 154, 155
- «Репликазные частицы» II: 291
- Репликативная промежуточная форма (РПФ) II: 212, 230
- форма (РФ) ДНК III: 80—81
- РНК II: 230
- Репликация abortивная III: 161
- литический цикл I: 286; III: 40, 117—118
- первичная I: 281—282
- по механизму катящегося кольца I: 167
- ретровирусов I: 440—441, 448—461
- — интеграция вирусной ДНК I: 455—457
- — ранние события I: 449
- — синтез вирусных белков и сборка вирионов I: 459—461
- — — неинтегрированной (свободной) вирусной ДНК I: 449—451, 453—455
- — экспрессия вирусной ДНК I: 457—459
- РНК, отличия от транскрипции II: 429—430
- РНК-содержащих вирусов с негативным геномом I: 132—133, 156, 157; II: 458, 466—467, 475
- — — позитивным геномом I: 132; II: 212, 348—352
- Респираторно-синцитиальный вирус II: 478—479, 482
- Респираторные вирусные инфекции II: 124
- Рестрикционные карты I: 220—221
- Ретровирусные белки I: 441
- гликопротеины I: 445, 447
- Ретровирусы I: 133—134, 164, 329, 433—474
- амфотропные I: 445
- вирусные онкогены (*v-onc*) I: 216, 440, 441, 443—445, 465, 468, 470—472
- — трансформирующие гены I: 435
- в качестве векторов I: 445
- геном I: 133, 164, 216, 246, 436—437, 448; II: 436
- дефектные по репликации I: 441
- — — трансформации I: 441
- интеграция с клеточной ДНК I: 455—456; III: 306
- классификация I: 437, 439
- клеточные рецепторы I: 445, 446, 447, 449
- — трансформирующие гены (клеточные онкогены) I: 473—474
- компетентные по репликации I: 441
- морфология и морфогенез вирионов I: 439—440
- мутантные I: 247
- необычные свойства I: 434—436
- патогенность *v-onc*-вирусов I: 465—473
- первые изоляты I: 434
- последствия инфекции III: 353—354
- проникновение вирионов в клетки I: 449
- размножение, влияние интерферона II: 65
- распространение I: 447—448
- рекомбинация I: 463—464
- репликативный цикл I: 448
- репликация I: 448—449, 450, 451, 453
- синтез вирусной ДНК I: 453—455
- спектр хозяев I: 445—447
- структура вириона I: 436
- типа С I: 48, 216, 440, 448
- трансформация клеток I: 216—217, 435, 436
- цикл репродукции I: 134
- чувствительность к видабину II: 96
- экзогенные III: 353
- экотропные I: 445
- экспрессия вирусной ДНК I: 457—459
- эндогенные III: 353
- Рецепторы клеточные для вирусов I: 127—128, 284—285
- Рибавирин II: 115
- Рибонуклеопротеин (РНП), плюс- и минус-геномные РНК II: 435
- рабдовирусов II: 434, 436
- Римантадин II: 127—128, 129
- Риновирус человека, белок 3СD II: 198
- Риновирусы, адсорбция II: 216
- лошадей II: 192, 193, 218
- рецепторы II: 218
- человека II: 190, 192, 216, 221, 225
- — бляшки II: 207
- — протомер II: 201—202
- — цикл размножения II: 213
- Рифампицин III: 268, 274
- РНК буньявирусов большая (L) II: 372
- — малая (S) II: 372
- — сегмент L II: 378, 379, 380, 383
- — — М II: 372, 375, 378, 379, 380, 382, 383

- — — S II: 372, 376, 378, 379, 380, 382
- — — синтез, влияние актиномицина D II: 374—375
- — — средняя (M) II: 372
- — — вируса везикулярного стоматита I: 318
- — — гриппа, репликация II: 477—478
- — — вирусная, последовательности R, U3 и U5 I: 453
- — — синтез III: 82—84
- — — транскрипция I: 322, 323, 457—458
- — — геномная, генетические маркеры сегментов II: 324
- — — матрица для транскрипции и репликации I: 132
- — — пикорнавирусов II: 194—199
- — — белок-кодирующая область II: 197—198
- — — генетическая рекомбинация II: 198—199
- — — механизм упаковки II: 239—240
- — — связь с белком VPg II: 195—196
- — — участок poly(C) II: 196
- — — чувствительность к рибонуклеазе II: 194
- — — функция матрицы I: 131, 132
- — — электрофоретическая подвижность сегментов II: 321, 325
- — — двухцепочечная как индуктор интерферона II: 49
- — — клеточная, метаболизм III: 224
- — — подавление синтеза II: 225—226
- — — синтез III: 224
- — — полиовируса I: 315
- — — реовирусов II: 266—267
- — — репликативная форма (РФ) II: 230
- — — ретровирусов I: 436, 448, 453, 458—459
- — — флебовирусов, сегменты L, M и S II: 385, 386
- — — ядерная, подавление синтеза пикорнавирусами II: 226
- — — L и S аренавирусов II: 395, 397
- РНКазы L II: 60
- РНК-геном негативный II: 448, 451, 468
- сегментированный двухцепочечный I: 223
- РНК-геномы, спонтанные мутации I: 186
- РНК-полимераза III: 258
- II вируса гриппа II: 459—460
- — — простого герпеса III: 206
- — — пикорнавирусов, ингибирование  $\alpha$ -аманитином II: 226
- — — поксвирусов III: 267
- — — РНК-зависимая (транскриптаза) II: 191, 280—281, 452, 458—459; III: 14, 17
- РНК-полимеразы, ингибирование  $\alpha$ -аманитином II: 226, 447, 477
- РНК-содержащие вирусы I: 74, 130—135, 149—164, 207, 220, 222, 235, 318, 433
- — — генетическая рекомбинация II: 198—199
- — — геном II: 427
- — — геномы ДИ-частиц I: 149—164
- — — одноцепочечные I: 130—134
- — — делеционные мутанты II: 177—178
- — — клонирование генов II: 154
- — — межтипковые скрещивания I: 205, 206
- — — однохромосомные I: 207
- — — опухолеродные I: 145, 164. См. также Онковирусы
- — — пикорнавирусы II: 190—241
- — — с двухцепочечной РНК I: 130, 134—135
- — — негативным геномом, инфекционный цикл II: 425
- — — — несегментированным II: 477
- — — — репликация I: 156, 157; II: 475
- — — одноцепочечной РНК I: 130—134
- — — сегментированным геномом I: 173
- — — семейство Arenaviridae II: 366, 392—403
- Ротавирусы II: 257, 258, 260, 262, 267
- геном II: 259—260
- диарея новорожденных II: 262
- клеточные рецепторы II: 260
- нейрамнидаза II: 260
- патогенез I: 280
- мРНК II: 260, 261
- связь репликации с эндоплазматическим ретикуломом II: 262
- структура II: 258—259
- эндосомы II: 260
- Сайт инициации трансляции II: 196
- присоединение полимеразы II: 427
- Сайт-специфический мутагенез I: 224—225, 253—254; III: 163, 164, 212
- Сайты интеграции провирусов I: 466

- специфического связывания большого Т-антигена III: 45, 49, 51
- Саркома Капоши I: 350, 359
- остеогенная II: 38
- Сборка вирионов I: 136—137; II: 357—359, 438—439, 470—473, 480, 481; III: 20—22, 156—159
- вируса осповакцины III: 268—271
- нуклеокапсида I: 157—158, 175
- оболочки вириона II: 436
- природных пустых капсидов (ППК) II: 237
- реовирусов II: 261, 290—291
- тогавирусов II: 343, 357—359
- Световой микроскоп, выявление субклеточных структур I: 307
- — тельца внутриклеточных включений I: 287
- Сегментированный геном реовирусов I: 130, 134; II: 259—260, 266
- Сегменты РНК буньявирусов II: 378, 380
- Сердце, патологические изменения II: 314
- Серологические тесты I: 265
- Серотипспецифическая гиперчувствительность замедленного типа (ГТЗ) II: 306
- Серотипспецифические Т-супрессоры II: 306
- Серозэпидемиология HTLV-I III: 345—348
- Сигнал инициации связывания N-белка с лидерной РНК II: 434
- Сигналаза II: 354, 355
- «Сигнальная последовательность» II: 353
- Сигнальная последовательность III: 19
- — р62 II: 354
- Симметрия вирусных частиц I: 58—64
- — — икосаэдрическая I: 59—64
- — — спиральная I: 58—59
- Синдром врожденной краснухи, лейкоцитарный интерферон II: 126
- Герстманна—Штраусслера III: 416
- Гильен — Барре II: 161
- денге шоковый I: 290
- карликовости II: 301, 316—317
- маслянистой шерсти II: 316—317
- приобретенного иммунодефицита III: 358, 436. См. также СПИД и HTLV-III
- Сезари III: 333, 334
- Чедьяк — Хигаши II: 20, 30
- Синтез вирусной ДНК I: 435, 449, 452, 453—455
- — РНК II: 230—231
- — — роль мембран II: 230
- ДНК аденовирусов III: 128, 139—146
- — вируса гепатита В III: 301, 304, 305—306
- — клеточных II: 225; III: 116—117
- РНК адено-ассоциированных вирусов (AAV) III: 82—84
- — вируса гриппа А II: 453, 460—462
- — — Сендай, инициация II: 478
- — — пикорнавирусов II: 229—230
- — — кинетика II: 230—231
- — — образование вирионов II: 238—239
- — — роль мембран II: 230
- — рабдовирусов, влияние лизосомотропных аминов II: 424
- Синтетические пептиды I: 116—117
- — как иммуногены II: 152—154
- Система комплемента, генетические повреждения II: 30
- Скелетные белки I: 311
- Склероз боковой амиотрофический III: 437, 438, 439
- рассеянный III: 436
- Скрейпи I: 296; III: 384, 389, 419—430, 433, 439, 440
- амилоидные фибриллы III: 387, 439
- аутоантитела III: 387, 427, 429, 440
- генетический контроль инфекционности III: 424
- изменения плазматической мембраны III: 421
- патология и патогенез III: 421
- передача возбудителя III: 419
- специфический белок III: 425
- сравнение с куру III: 407
- устойчивость к инаktivации III: 425—426
- Скрещивания двухфакторные I: 198—201, 219
- межтиповые I: 204—207
- многофакторные I: 204
- трехфакторные I: 201—204
- Слизистые оболочки, размножение вирусов II: 149—150
- Слияние изнутри II: 481
- клеток II: 146; III: 6, 9
- клеточных мембран вирус-индуцированное II: 481
- мембран I: 105, 106, 107, 108, 109; II: 474, 481
- — белок F вируса Сендай I: 105, 107
- — пептид слияния I: 107, 109



- оболочки вируса с клеточной мембраной I: 86; III: 14
- VSV с мембраной II: 424
- Соматомедин II: 70
- «Спасение» вируса I: 441; III: 89—90
- Спасение маркера I: 145, 209, 241—243, 256; III: 165, 274
- картирование *ts*-мутаций I: 221
- СПИД, антитела к HTLV-III III: 368, 369
- горизонтальное распространение ретровирусов III: 370
- изоляты HTLV III: 337
- Т-клеточная недостаточность III: 358
- клинические проявления III: 358
- связь с HTLV-III III: 370
- способы передачи III: 370
- терапевтические подходы III: 371
- эпидемиологические особенности III: 358
- Сплайсинг мРНК I: 368, 458—459; II: 464; III: 125, 148, 150—151
- вирус гриппа II: 477
- транскрипта у ретровирусов I: 444
- Спумавирусы I: 437
- Структуры вирусных частиц спиральные и изометрические I: 55
- Субансамбли I: 56, 57
- Субклиническая папилломавирусная инфекция (СПИ) I: 351—352
- Супериндукция интерферона II: 52, 117, 120
- Суперинфекция, повреждение тканей II: 92
- фагами, иммунитет I: 169—170
- Супрессия I: 211—213
- интрагенная I: 212
- экстрагенная I: 212
- Т-супрессоры (Ts) II: 6, 16—17
- активность при гепатите III: 311
- Сыворотки больных СПИДом, антитела к HTLV-III III: 367—370
- Strong-stop-ДНК I: 452, 454
  
- Таксономия вирусов I: 20—52
- универсальная система I: 21—26
- Телеоцидин II: 42
- Температурочувствительные (*ts*) мутанты I: 189—190, 192, 204, 205, 211; II: 48, 170, 469
- буньявирусов II: 378—379
- интерференция I: 211
- межтипковые скрещивания I: 205—206
- рабдовирусов II: 422, 438, 440, 442
- рекомбинационная карта I: 200
- реовирусов II: 307, 321, 322
- мутаций, картирование I: 205, 206, 221
- Технология рекомбинантных ДНК II: 469
- Тимидинкиназа I: 295; II: 89; III: 205, 260
- Тирозинкиназа, связывание с цитоскелетом I: 324
- Тогавирусы II: 343—360
- адсорбция II: 344—346
- взаимодействие с клеткой-хозяином II: 359—360
- вирус-специфическая биологическая активность II: 343
- влияние интерферонов II: 58
- геном(ы) I: 130; II: 344, 347, 348
- ДИ-частицы II: 360
- продукт трансляции I: 132
- проникновение в клетки II: 345, 346—347
- репликация генома II: 343, 347—352
- сборка II: 343, 357—358
- синтез структурных белков II: 343, 353—355
- эндоцитоз II: 346—347
- Транс-активация I: 147
- Трансдукция генерализованная I: 144—145
- ограниченная I: 144
- Трансдуцирующие фаги I: 169
- Транскриптаза (РНК-зависимая РНК-полимераза) II: 191, 280—281, 458—459, 460; III: 14, 17
- буньявирусов II: 374
- вируса гриппа II: 459
- клеточная I: 129
- обратная (ревертаза) I: 16, 133—134, 236, 433, 434, 451—452; III: 305
- реовирусов II: 261
- Транскрипционные карты I: 222
- сигналы I: 238
- Транскрипция abortивная II: 275, 286
- активация большим Т-антигеном SV40 I: 369
- интерфероновых генов II: 45
- модель регуляции I: 158
- направление I: 366, 367, 465
- обратная I: 164, 409, 413, 445
- онкогена I: 465
- переключение с ранней на позднюю III: 147—148

- поздняя I: 147; III: 48—49, 146—147
- по консервативному механизму II: 281
- продукты I: 134
- ранняя III: 91—94, 120—129, 257—260
- регуляция III: 41—50
- РНК нуклеокапсида в качестве матрицы I: 157
- мРНК  $\beta$ -ИФН II: 54
- у вируса гриппа II: 458—465, 466, 467
- — — Сендай II: 476, 477
- — — SV40 III: 49, 50, 322
- — рабдовирусов II: 425—429
- — реовирусов II: 286—288
- — тогавирусов II: 349, 350
- — VSV II: 427—428, 430
- участок инициации I: 153; II: 275
- Трансляционные карты I: 223
- сигналы *E. coli* I: 238
- Трансляция, aberrантные продукты I: 160
- вирусных матриц в клетке-хозяине II: 261
- гибридизационный блок (HART) III: 104, 156, 165
- ингибирование двухцепочечной РНК II: 60
- первичная у коронавируса III: 15—16
- подавление метилирования II: 64
- полипротеин I: 131; II: 197, 229, 427
- мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе II: 68
- —  $\beta$ -интерферона II: 54
- сайт инициации II: 196
- субгеномной РНК альфавирусов II: 353—355
- у буньявирусов II: 374, 375
- — вирусов с позитивным геномом I: 131
- — реовирусов II: 289—290
- Трансплантаты костного мозга II: 24, 112
- Трансекция I: 240, 340
- Трансформация abortивная I: 367
- антигенная N — H II: 236—237
- клеток вирусами животных I: 215—217
- — вирусом SV40 I: 215, 333—334, 343, 344, 403; III: 56—57
- — ДНК-содержащими вирусами I: 248—250, 329—415
- — опухолеродными вирусами I: 14, 329
- — — Т-антигены аденовирусов I: 389—390, 391—392
- — — E1B аденовирусов I: 397—401
- — — молекулярная биология I: 363—366
- — — 12S-мРНК E1A аденовируса I: 396
- — — 13S-мРНК E1A аденовируса I: 393, 395
- — — функции трансформирующих генов I: 340—341
- — ретровирусами I: 443—444, 471
- — COS I: 244
- онкогенная (ростовая) I: 248, 340
- опухолевая III: 34
- — онс-гены клетки-хозяина I: 164
- поддержание III: 35
- Трансформированные клетки I: 343, 357, 358, 359, 398
- — общие свойства I: 341
- — репликация ДНК I: 377—379
- клеточные линии I: 343, 359, 362, 363, 371
- Трансформирующая область аденовирусов, организация и экспрессия I: 386—389, 390
- Трансформирующие белки I: 333, 365
- гены в опухолевых клетках I: 473—474
- — организация и экспрессия I: 366—368
- Триангуляционное число I: 63—64
- Трифлюридин (трифтортимидин) II: 108, 113, 114
- Тропность клеточная и тканевая II: 299; III: 308
- Универсальная система таксономии вирусов I: 21—26
- Упаковка генома I: 125, 461
- 53S-полуоболочек II: 241
- РНК, механизм II: 239—240, 241
- Условно-дефективные вирусы I: 148
- Условно-летальные мутанты III: 208, 211—212, 273—274
- температурочувствительные мутанты I: 190; III: 163
- Укук вирусы, передача клешнями II: 369
- родовые свойства II: 390—391
- сегменты РНК II: 370
- структурные белки II: 370
- УФ-инактивация, ингибирование транскрипции II: 427
- УФ-облучение вируса ньюкаслской болезни II: 49—50
- реовирусов II: 49, 284
- — индукция интерферона II: 50, 307

- — — толерантности II: 306, 307
- — подавление синтеза ДНК II: 293
- Участок инициации транскрипции I: 153; II: 275
- начала репликации III: 51—54
- Фагоцитарные вакуоли II: 285
- Фагоцитоз («виropексис») II: 220, 285, 374
- Фактор активации макрофагов (ФАМ) II: 72
- активирующий лимфоциты (ФАЛ) II: 10—11
- морфопоэтический II: 237—238
- роста Т-клеток человека (TCGF) I: 468
- тромбоцитов (PDGF) I: 473; II: 70
- — эпидермальный (ЭФР) II: 70
- торможения миграции макрофагов (ФТМ) II: 22
- Факторы роста инсулиноподобные (ИПФР) II: 70
- — нейронов II: 70
- — трансформирующие II: 70
- Фенотип вирусной мутации, супрессия I: 211—213
- Фенотипические тесты I: 251
- Фенотипическое смешивание I: 75, 213—214
- — образование псевдотипа I: 214
- — у вируса гриппа II: 470
- — — парамиксовирусов II: 479
- Ферментативные активности реовирусов II: 280
- Ферменты синтеза РНК паповавирусов II: 453
- Фибриллы амилоидные III: 387, 427, 430, 440
- связанные со скрейли (ФСС) III: 387, 388, 427—430, 439, 440
- Фибробластный интерферон II: 94, 116, 120, 122
- Фибромы I: 347
- Фибропапилломы I: 347
- Фидживирусы II: 257
- Фитовирусы II: 257
- Фитогемагглютинин II: 42
- Флавивирусы II: 343, 344, 345, 358
- белковый синтез вирус-специфический II: 359
- внутренние везикулы II: 358
- геном II: 344
- латентный период II: 359—360
- репликация II: 359
- сравнение с альфавирусами II: 359
- структура нуклеокапсида II: 347
- Флебовирус Пунта Торо II: 385, 387
- Флебовирусы II: 366, 370, 384—387
- гликопротеины II: 370, 385
- нуклеокапсиды II: 370, 385
- передача II: 369
- свойства II: 385—386
- сегменты вирусной РНК II: 370, 385
- серологическая классификация II: 384—385
- стадии репликации II: 386—387
- Фокусы выживающих клеток (негативные бляшки) I: 143—144
- Фосфоноуксусная и фосфономуравьиная кислоты II: 130—131
- Фрагменты Оказаки III: 52, 53, 134—135, 136
- Фториодарацитозин (ФИАЦ) II: 113
- Фузионная активность вируса гриппа I: 106—109
- Фузионный пептид (пептид слияния) I: 107, 109
- Функция иммортализации I: 334, 335, 411, 412
- Хелперные функции аденовирусов III: 91—94
- Т-хелперы II: 6, 13—14; III: 358
- Хлорид аммония, подавление литической реовирусной инфекции II: 310
- — слияние VSV с мембраной II: 424
- Хлорохин, слияние VSV с мембраной II: 424
- Холодоадаптированные мутанты (*сa*-мутанты) II: 170, 171, 469
- Холодочувствительные (*сs*) мутации I: 190
- Хориоменингит лимфоцитарный (LCM) I: 171, 283, 293; II: 14
- — асептический II: 393
- Хроматин I: 307, 308, 309, 321, 322, 324
- маргинация II: 225
- Хроматография аффинная III: 297
- иммуноаффинная II: 64
- Хроническая прогрессирующая патология (медленная инфекция) III: 385
- Хронические дегенеративные заболевания III: 436—437
- Хронический гепатит В II: 104; III: 309—314
- гломерулонефрит II: 402
- Хроническое истощение (энцефалопатия) у одомашненных оленей и лосей III: 384, 430, 433, 434
- HTLV, Тас-антиген I: 468
- гены *gag*, *pol* и *env* III: 340



- изоляты III: 336, 337
- морфология С-типа I: 440
- провирусный геном III: 339
- HTLV-I, гены *onc* III: 353—355
- гликопротеин оболочки III: 342—343
- изоляты III: 335—337
- иммунные функции Т-клеток III: 356—358
- молекулярная эпидемиология III: 348—349
- молекулярный механизм трансформации клеток III: 353—358
- сероэпидемиология III: 345—348
- способ передачи III: 347
- трансформация Т-лимфоцитов III: 349—353
- характерные особенности трансформированных Т-лимфоцитов III: 350—352
- HTLV-I и HTLV-II III: 331—358
- — — антигенные свойства III: 365—366
- — — белки III: 340—344
- — — белок рХ III: 343—344
- — — выделение III: 334—338
- — — гены *gag*, *pol* и *env* III: 339, 340, 343
- — — Т-клеточный фактор роста (ТКФР) III: 332, 333, 334, 345, 352, 354
- — — молекулярное клонирование III: 339
- — — нуклеиновые кислоты III: 338—339
- — — обратная транскриптаза III: 338, 342
- — — организация генов III: 339
- — — провирусная ДНК III: 339
- HTLV-III, антигенные свойства III: 365—366
- биологические свойства *in vitro* III: 363—365
- взаимосвязь с HTLV-I и HTLV-II III: 360, 365—367
- геном III: 366—367
- изоляты от больных СПИДом III: 359—363
- полиморфизм III: 366—367
- свойства нуклеиновых кислот III: 366—367
- связь со СПИДом III: 370
- способы передачи III: 370
- цитопатический характер инфекции III: 371
- Цезий, включение в полиовирус II: 205
- Центральная нервная система (ЦНС),
  - вирулентность вирусов I: 288, 289
  - — — герпетическое поражение II: 99, 101
  - — — гипотеза патогенеза дегенеративных заболеваний III: 437—440
  - — — заболевания II: 149
  - — — заражение реовирусами II: 312—314
  - — — ослабленный иммунитет I: 297
  - — — персистентная вирусная инфекция I: 294
  - — — репликация энтеровирусов I: 280
  - — — рецепторы клеток (нейронов) I: 285
- Цервикальная эпителиальная дисплазия I: 352
- Цикл размножения пикорнавирусов II: 211—214
- — — латентный период II: 213
- — — экспоненциальная фаза II: 213
- репликации альфавирусов II: 353
- — литический I: 286; III: 40, 117—118
- репродукции вирусов I: 125—126
- Циклогексимид как ингибитор трансляции II: 52, 429; III: 125, 126
- Циклы передачи вирусов I: 268
- Циповирусы II: 257
- Цирроз при HBV-инфекции III: 309, 312, 314
- Цис-действующие последовательности вирусной ДНК III: 216
- Циститы геморрагические острые III: 103
- Цитарабин (цитозинарабинозид) II: 94, 114
- Цитозин, дезаминирование азотистой кислотой I: 187
- Цитолитические вирусы I: 127
- Т-лимфоциты I: 291
- Цитомегаловирус (CMV) I: 283; II: 91, 105, 113, 121, 125, 126; III: 359
- вирус-специфические Тс-клетки II: 24
- человека (HCMV) I: 295, 358—359, 404—405
- Цитомегаловирусные инфекции II: 103, 112, 126
- Цитопатический эффект I: 287, 308, 318; II: 225, 265, 309, 442, 469
- Цитоплазма I: 84, 95, 128, 129, 136, 319, 323; II: 223, 225, 227, 374; III: 117, 257, 304

- образование нуклеокапсидов II: 357; III: 20
- репликация вирусов II: 261, 346, 347, 439; III: 264
- Цитоплазматические вакуоли I: 128
- вирусы I: 315—320
- и ядерные скелетные структуры I: 307—313
- микротрубочки, взаимодействие с вирусами I: 322, 323; III: 87, 90—95, 160
- центры репликации ДНК («фабрики») III: 264
- Цитоскелет (клеточный скелет) I: 308, 311, 312, 314, 318, 319, 322, 323, 324
- перестройка под влиянием вирусной инфекции I: 308, 318, 323
- Цитотоксические Т-лимфоциты II: 8, 14—16, 305—306, 402
- Цитотоксический эффект Т-специфический II: 20
- Цитотоксичность III: 310, 311
- Цитоидные (*cyt*) мутанты I: 399
- Частицы вирусные см. Вирусные частицы
- Дейна III: 288—289, 306
- — ДНК-полимеразная активность II: 104
- Частота трансляции и транскрипции реовирусных генов II: 288
- Членистоногие как переносчики вирусов I: 271—272; II: 344—345, 381—382
- Эволюция вируса и клетки-хозяина I: 172—174
- вирусов, общая модульная теория I: 172—174
- ЭДТА, подавление адсорбции вирусов II: 216
- Экзогенный интерферон как противовирусный агент II: 116, 123—127
- Экзон III: 130
- Эклипсная фаза размножения вирусов I: 126
- Экология вирусов I: 275
- Экспоненциальная фаза размножения пикорнавирусов II: 213
- Экспрессия Т-антигена вируса SV40 I: 245
- вирусных генов временная I: 247—248
- гена интерферона, подавление репрессорами II: 52
- ДНК вирусов животных в клетках дрожжей I: 239—240
- — — — — млекопитающих I: 240
- — — — — *Escherichia coli* I: 237—239
- и репликация вирусного генома I: 130—136
- клонированных генов II: 44—46
- Экстрагенная реверсия II: 323
- Электронная микроскопия без залива-ки I: 169—308
- — — — — две методики I: 309—311, 312, 313
- — главный недостаток I: 169
- — ультраструктура вирусных частиц I: 16
- — цитоскелета и ядерных структур I: 307—314
- Электронно-микроскопический анализ тонких срезов клеток III: 192, 248—249, 268—270
- Электрофорез в ДСН—ПААГ полипептидов II: 294, 296
- — полиакриламидном геле I: 15, 274
- Эндемные провирусы I: 447, 462—463
- Эндонуклеазы рестрикции I: 184, 224, 236, 266
- Эндоплазматический ретикулум (ЭР) I: 92, 93, 94
- — репликация ротавирусов II: 262
- — синтез белков рабдовирусов II: 436—437
- Эндосомы I: 105, 106; II: 346, 474, 475
- Эндотоксины бактериальные II: 51
- Эндоцитоз II: 346
- адсорбционный II: 346, 347
- окаймленные клатрином пузырьки II: 285
- «окаймленные ямки» II: 285
- опосредованный рецепторами II: 424
- проникновение вирусов в клетку I: 105—106; II: 285, 346
- роль в инфекционном процессе II: 424
- Энтеровирус бычий I: 118
- Энтеровирусы (кишечные вирусы) I: 13, 280; II: 191
- крупного рогатого скота II: 218
- физическая карта генов I: 184
- Энцефалит I: 274, 284; II: 317
- Энцефалиты герпетические II: 99, 100—101, 107, 125, 130
- Энцефалопатии вирусные спонгиозные подострые I: 296—297; III: 383—

440. См. также Болезнь Крейц-фельдта—Якоба, Куру, Скрейпи  
 — — — медленные вирусные инфекции III: 384  
 — — — основная особенность III: 384, 386  
 Энцефалопатия норок III: 384, 430  
 Эпидемиология вирусных инфекций I: 264—268  
 — — — методы I: 265—268  
 — молекулярная I: 266—267  
 — серологическая I: 265—266  
 — экологическая I: 267—268  
 Эпидемические кератоконъюнктивиты (ЭКК) III: 103  
 Эпидермальный фактор роста II: 70  
 Эпидермодисплазия бородавчатая (БЭ) I: 348  
 Эпителиальные герпетические кератиты II: 113  
 Эпитоп «нейтрализующий» II: 305  
 Эпитопы II: 9, 304, 305, 371  
 Эритролейкоз Френд II: 71—72  
 Эукариотические клетки, цикл репродукции вирусов I: 125—126  
 — — экспрессия вирусных генов I: 125, 247—248  
 — — — клонированной ДНК II: 178  
 Эффект праймирования II: 154  
 Ядерная мембрана I: 137; III: 139, 186, 203, 219, 220  
 — РНК, подавление синтеза II: 226  
 Ядерно-цитоплазматические взаимодействия I: 320  
 Ядерные антигены вируса Эпштейна—Барр (EBNA) I: 238  
 — вирусы I: 320, 322—324; III: 89  
 — поры III: 203  
 — транскрипты III: 117  
 Ядерный матрикс I: 308, 309, 321, 322, 325  
 — — визуализация I: 313, 314  
 — — нуклеокапсиды вируса герпеса I: 324  
 — мембранный комплекс III: 139  
 — скелет I: 307  
 Ядра клеток I: 307; III: 44, 139, 304  
 — — экстракты III: 140, 141, 143  
 Ядро I: 136, 320, 323, 400; III: 32, 117, 120  
 — репликация аденовирусной ДНК III: 133—134  
 — — ДНК и сборка парвовирусов III: 74, 75  
 — — и транскрипция герпесвирусов I: 323; III: 201  
 — сборка вирионов I: 136; III: 32, 156, 159, 186, 219  
 — синтез вирус-специфических мРНК аденовирусов III: 104



<b>Глава 25. Репликация коронавирусов.</b> <i>Кэтрин В. Холмс</i>	5
Структура вирионов	7
Коронавирусы животных	10
Коронавирусы человека	10
Размножение коронавирусов	11
Репликация коронавирусов	13
Прикрепление и проникновение	15
Первичная трансляция	15
Синтез минус-цепи РНК	16
Синтез плюс-цепи РНК	16
Синтез структурных и неструктурных белков	17
Сборка вирионов	20
Заключение	22
Литература	23
<b>Глава 26. Репликация паповавирусов.</b> <i>Дэвид М. Ливингстон, Илан Бикел</i>	30
Структура вирионов и начало инфекции	31
Экспрессия ранних генов и функция их продуктов	33
Транскрипционные единицы вируса РУ и SV40	41
Регуляция транскрипции вируса РУ	41
Регуляция транскрипции SV40	46
Механизм репликации ДНК SV40	50
Участок начала репликации	51
Интеграция геномов паповавирусов	54
Литература	57
<b>Глава 27. Репликация парвовирусов.</b> <i>Кеннет И. Бернс, Николас Музычка, Вильям В. Хаусвирт</i>	67
Вирион	67
Геном	69
Белки капсида	72
Продуктивная инфекция	73
Репликация ДНК	75
Синтез РНК	82
Синтез белков	84
Дефектные интерферирующие частицы	85
Латентная инфекция AAV	87
Взаимодействие между AAV и аденовирусом	90
Функции аденовируса-помощника	91
Подавление аденовирусной репликации	94
Подавление аденовирусной онкогенности	94

Заключение . . . . .	95
Литература . . . . .	96

<b>Глава 28. Аденовирусы и их репликация. Маршал С. Хор- виц . . . . .</b>	<b>103</b>
Структура вируса . . . . .	104
Размер, форма и химический состав . . . . .	104
Вирионная ДНК . . . . .	106
Вирионные полипептиды . . . . .	108
Неструктурные вирус-специфические полипептиды . . . . .	111
Классификация . . . . .	112
Гемагглютинация эритроцитов крыс или макаков-резусов . . . . .	112
Онкогенность для грызунов . . . . .	113
Состав оснований и гомология ДНК . . . . .	114
Взаимосвязи между Т-антигенами . . . . .	114
Карта расщепления аденовирусных геномов рестрикцион- ными эндонуклеазами и набор вирусных полипептидов . . . . .	115
Цикл репликации . . . . .	116
Прикрепление, проникновение, раздевание . . . . .	118
Ранняя транскрипция . . . . .	120
Ранние белки . . . . .	129
Репликация ДНК аденовирусов . . . . .	133
Поздняя транскрипция . . . . .	146
Поздние полипептиды . . . . .	155
Взаимодействие аденовирусов с другими вирусами . . . . .	160
SV40 — вирус-помощник аденовирусов . . . . .	161
Гибридные вирусы . . . . .	162
Генетика вирусов . . . . .	163
Получение мутантов аденовирусов . . . . .	163
Картирование мутаций аденовирусов . . . . .	164
Картирование генов без мутантов . . . . .	165
<i>ts</i> -Мутанты Ad5 . . . . .	165
<i>ts</i> -Мутанты Ad2 . . . . .	166
Мутанты других серотипов . . . . .	167
Литература . . . . .	167
<b>Глава 29. Герпесвирусы и их репликация. Бернارد Ройз- ман, Уильям Баттерсон . . . . .</b>	<b>186</b>
Общее определение и свойства . . . . .	186
Классификация . . . . .	189
Alphaherpesvirinae . . . . .	189
Betaherpesvirinae . . . . .	189
Gammaherpesvirinae . . . . .	189
План изложения . . . . .	190
Вирион . . . . .	190
Архитектура . . . . .	190
ДНК . . . . .	192
Полипептиды, входящие в состав вириона . . . . .	198
Репликация герпесвирусов . . . . .	201
Общее описание репликации . . . . .	201
Начальные стадии заражения . . . . .	202
Экспрессия вирусных генов . . . . .	204
Функции вирусных генов . . . . .	206
Синтез вирусной ДНК, сборка и выход вируса из заражен- ной клетки . . . . .	217

Судьба зараженной клетки . . . . .	223
Общие замечания . . . . .	223
Литература . . . . .	227

## Глава 30. Репликация поксвирусов. *Бернард Мосс* . . . 246

Классификация . . . . .	246
Структура вириона . . . . .	248
Морфология . . . . .	248
Химический состав . . . . .	249
Полипептиды . . . . .	250
Ферменты . . . . .	251
Геном . . . . .	253
Репликативный цикл . . . . .	256
Общие признаки . . . . .	256
Адсорбция, проникновение в клетку и раздевание . . . . .	256
Ранняя транскрипция . . . . .	257
Ранние белки . . . . .	261
Репликация ДНК . . . . .	264
Поздняя транскрипция . . . . .	266
Поздние белки . . . . .	268
Сборка вируса, созревание и выход из клетки . . . . .	268
Перестройка клеточного синтеза макромолекул . . . . .	272
Синтез белков . . . . .	272
Синтез нуклеиновых кислот . . . . .	273
Мутанты . . . . .	273
Условно-летальные мутанты . . . . .	273
Мутанты, устойчивые к ингибиторам . . . . .	274
Мутанты с измененным спектром хозяев . . . . .	274
Гибридные вирусы . . . . .	274
Литература . . . . .	275

## Глава 31. Вирус гепатита. *В. У. С. Робинсон* . . . 287

Обнаружение и природа форм вируса, встречающихся в крови . . . . .	288
Структура поверхностного вирусного антигена . . . . .	293
Структура вирусных нуклеокапсидов . . . . .	299
Природа е-антигена гепатита В . . . . .	300
Физическая и генетическая структура вирусной ДНК . . . . .	301
HBV в зараженных клетках и механизм репликации вируса . . . . .	303
Тканевая тропность . . . . .	308
Патогенез заболеваний, вызываемых HBV . . . . .	308
Острый и хронический гепатиты В . . . . .	309
Первичная гепатоцеллюлярная карцинома (гепатома) . . . . .	314
Литература . . . . .	317

## Глава 32. Вирусы Т-клеточных лейкозов человека.

<i>М. Г. Сарнгадхаран, П. Д. Маркхэм, Р. Галло</i> . . . . .	331
Часть I: HTLV-I и HTLV-II . . . . .	331
История вопроса . . . . .	331
Т-клеточный фактор роста и размножение Т-клеток . . . . .	332
Инфекционные агенты . . . . .	334
Выделение вируса Т-клеточного лейкоза человека (подгруппы I и II) . . . . .	334
Нуклеиновые кислоты . . . . .	338



Белки . . . . .	340
Клинические особенности . . . . .	344
Эпидемиология . . . . .	345
Сероэпидемиология HTLV-I . . . . .	345
Молекулярная эпидемиология HTLV-I . . . . .	348
Патогенез . . . . .	349
Трансформация свежих Т-лимфоцитов человека HTLV-I . . . . .	349
Характерные особенности клеток, трансформированных HTLV-I . . . . .	350
Клеточный и иммунологический регуляторный потенциал Т-лимфоцитов, трансформированных HTLV-I . . . . .	352
Молекулярный механизм трансформации клеток HTLV-I . . . . .	353
Влияние HTLV-I на иммунные функции Т-клеток . . . . .	356
Часть II: HTLV-III . . . . .	358
Клинические проявления . . . . .	358
Инфекционный агент . . . . .	359
Выделение HTLV от больных СПИДом и пре-СПИДом . . . . .	359
Биологические свойства . . . . .	363
Связь HTLV-III с HTLV-I и HTLV-II . . . . .	365
Эпидемиология . . . . .	367
Сывороточная эпидемиология . . . . .	367
Способы передачи HTLV-III . . . . .	370
Заключительные замечания . . . . .	370
Литература . . . . .	371

### Глава 33. Неканонические вирусы, вызывающие подострые спонгиозные энцефалопатии. *Д. Карлтон. Гайдушек* . . . . .

Куру . . . . .	391
Клиническая картина . . . . .	392
Морфологическая картина . . . . .	398
Клинико-лабораторные наблюдения . . . . .	401
Эпидемиология . . . . .	402
Этиология . . . . .	406
Вирусная деменция (болезнь Крейцфельда—Якоба) . . . . .	411
Клиническая картина . . . . .	411
Передача . . . . .	411
Спектр клинических синдромов вирусной деменции . . . . .	414
Эпидемиология . . . . .	414
Проявление семейной формы БКЯ детерминруется одним аутосомным доминантным геном . . . . .	416
Аутоиммунный ответ на (10nm)-нейрофиламенты . . . . .	416
Предосторожности . . . . .	417
Терапия . . . . .	418
Скрейпи . . . . .	419
Клиническая картина . . . . .	419
История передачи . . . . .	419
Эпидемиология . . . . .	419
Патология и патогенез . . . . .	421
Генетический контроль инфекционности . . . . .	424
Вирус скрейпи . . . . .	424
Фибриллы, связанные со скрейпи . . . . .	427
Энцефалопатия норок . . . . .	430
Спонгиозная энцефалопатия лосей и оленей . . . . .	430
Происхождение и распространение куру . . . . .	431

Гипотетическая общая естественная история БКЯ, куру, ЭН и энцефалопатии оленей и лосей . . . . .	432
Попытки обнаружить вирус при других хронических деге- неративных заболеваниях . . . . .	436
Попытка создать общую гипотезу патогенеза многих деге- неративных заболеваний ЦНС . . . . .	437
<b>Литература . . . . .</b>	<b>440</b>
<b>Список сокращений . . . . .</b>	<b>451</b>
<b>Указатель латинских названий . . . . .</b>	<b>453</b>
<b>Предметный указатель . . . . .</b>	<b>455</b>

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва  
1-й Рижский пер., д. 2,  
издательство «Мир»



Учебное издание

Кэтрин Холмс, Дэвид Ливингстон, Илан Бикел и др.

## ВИРУСОЛОГИЯ

Под ред. Б. Филдса, Д. Найпа при участии Р. Ченока, Б. Ройзмана, Дж. Мелника, Р. Шоупа

В 3-х томах

Том 3

Заведующий редакцией чл.-корр. АН СССР Т. М. Турпаев

Зам. зав. редакцией М. Д. Гроздова

Научный редактор Т. И. Пономарева

Мл. редактор Р. Ф. Куликова

Художник В. Е. Карпов

Художественный редактор А. Я. Мусин

Технический редактор И. М. Кренделева

Корректор В. И. Киселева

ИБ № 6733

Сдано в набор 30.05.89. Подписано к печати 24.10.89. Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага книжно-журн. Печать высокая. Гарнитура латинская. Объем 15,5 бум. л. Усл. печ. л. 31. Усл. кр.-отт. 31. Уч.-изд. л. 36,58. Изд. № 4/5842. Тираж 12 800 экз. Заказ 1131. Цена 2 р. 80 к.

Издательство «Мир»

В/О «Совэксспорткнига» Государственного комитета СССР по печати.  
129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Госкомпечати СССР.  
Москва, 113105, Нагатинская, 1.

**В издательстве «Мир» выходит  
в свет в 1990 г.**

**Лимфоциты. Методы:** Под ред. Дж. Класа. Пер. с англ. — 25 л., 3 р. 30 к.

Методическое пособие, написанное авторитетными учеными из Великобритании, Норвегии и Швейцарии и дающее ответы практически на все вопросы, связанные с изучением лимфоцитов.

В руководстве описаны следующие методы: иммунофлуоресцентный и иммуногистохимический анализ. Культивирование. Генерация В-лимфобластоидных клеток человека с помощью вируса Эпштейна — Барр. Анализ пролиферации. Определение интерлейкинов и других продуцируемых лимфоидными клетками факторов. Биохимический анализ антигенов клеточной поверхности.

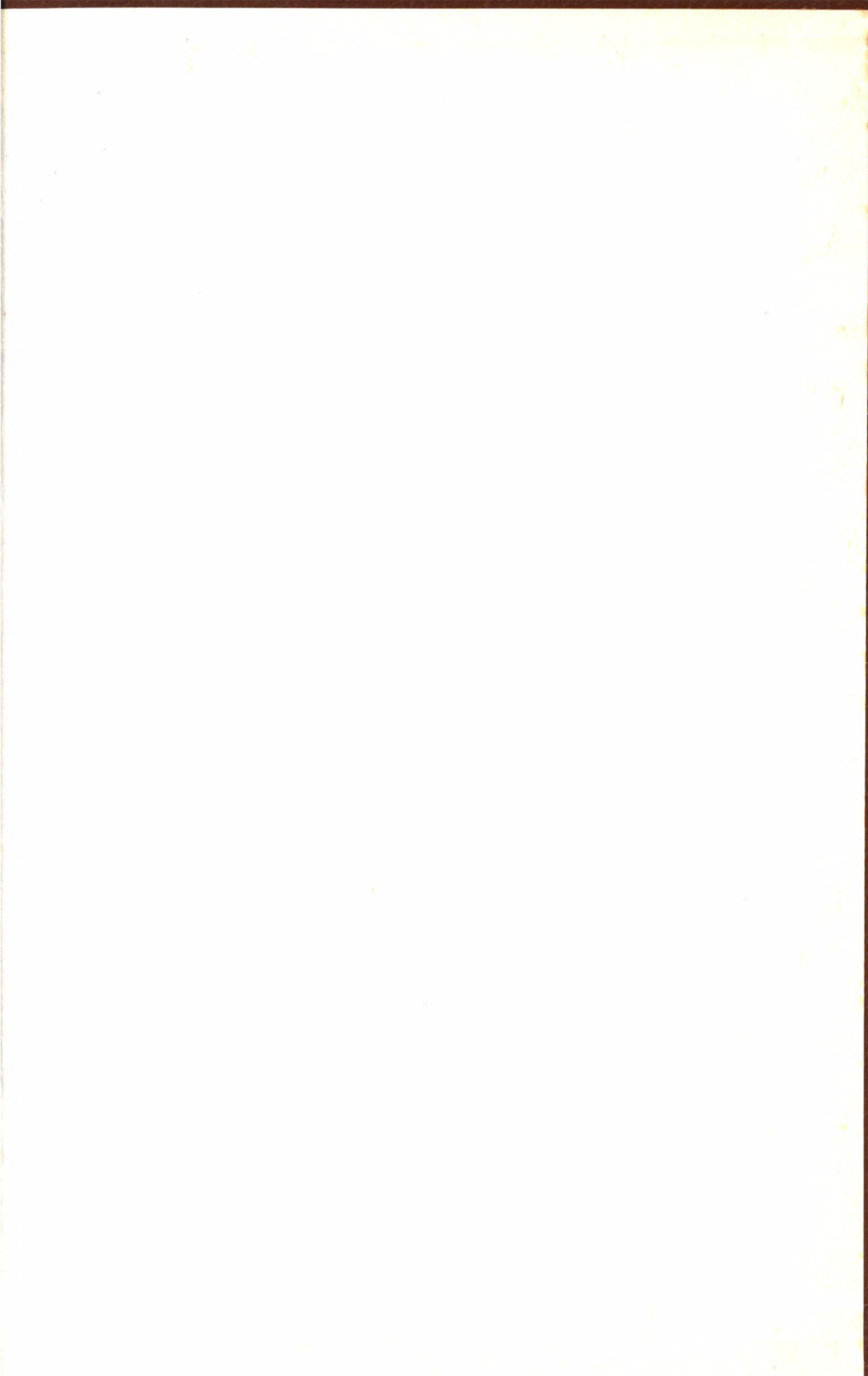
Материал изложен подробно, четко, с необходимым теоретическим обоснованием. Книга относится к зарекомендовавшей себя серии «Методы», издаваемой «ИРЛ Пресс» (Англия).

Для иммунологов, гематологов, молекулярных биологов, биохимиков.













3

BRANDY

